

# トリプルネガティブ乳癌におけるグルココルチコイド作用の臨床病理学的意義；アンドロゲンシグナルとの相互作用

著者	金井 綾子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第19048号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00129035">http://hdl.handle.net/10097/00129035</a>

博士論文

トリプルネガティブ乳癌におけるグルココルチコイド作用の臨床病理学的意義；

アンドロゲンシグナルとの相互作用

東北大学大学院 医学系研究科 医科学専攻

外科病態学講座 乳腺・内分泌学外科学分野

金井 綾子

## 目次

略語表	1
1. 要約	2
2. 研究背景	4
3. 研究目的	8
4. 研究方法	
4.1. ヒト乳癌組織を用いた実験	
4.1.1. 乳癌症例	9
4.1.2. 免疫組織化学	9
4.2. ヒト乳癌培養細胞を用いた実験	
4.2.1. 培養細胞	10
4.2.2. 細胞培養方法	11
4.2.3. アンドロゲン受容体導入細胞株の作製	11
4.2.4. 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction)	12
4.2.5. ウェスタンブロッティング	13
4.2.6. 細胞増殖実験	14
4.2.7. 細胞遊走実験	14
4.2.8. グルココルチコイド応答遺伝子の mRNA 発現	15
4.3. 統計解析	16
5. 研究結果	
5.1. TNBC 組織における GR 及び AR の発現意義	
5.1.1. TNBC 組織における GR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 の発現動態と臨床病理学的因子との関係	17
5.1.2. GR 陽性または GR 陰性 TNBC 組織における AR の発現動態と臨床病理学的因子との関係	18
5.1.3. AR 陽性または AR 陰性 TNBC 組織における GR の発現動態と臨床病理学的因子との関係	19
5.1.4. ヒト乳癌組織を用いた実験結果の概要	19
5.2. 乳癌細胞株における DEX 及び DHT の生物学的作用	
5.2.1. 乳癌細胞株における GR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 の発現	19
5.2.2. 乳癌細胞株における DEX 及び DHT が細胞増殖能に及ぼす影響	20
5.2.3. 乳癌細胞株における DEX 及び DEX/DHT が細胞遊走能に及ぼす影響	21

5.2.4. 乳癌細胞株における DEX 及び DEX/DHT が GC 応答遺伝子の mRNA 発現に及ぼす影響	22
5.2.5. ヒト乳癌細胞株を用いた実験結果の概要	23
6. 考察	24
7. 結論	30
8. 文献	31
9. 図	40
10. 表	61

## 略語表

11 $\beta$ HSD:	11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ ヒドロキシ脱水素酵素)
11 $\beta$ HSD1:	11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 1)
11 $\beta$ HSD2:	11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 2)
AR:	Androgen receptor (アンドロゲン受容体)
ARE:	Androgen response element (アンドロゲン応答配列)
DEX:	Dexamethasone (デキサメサゾン)
DFS:	Disease-free survival (無病生存率)
DHT:	Dihydrotestosterone (ジヒドロテストステロン)
ER:	Estrogen receptor (エストロゲン受容体)
FBS:	Fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
GC:	Glucocorticoid (グルココルチコイド)
GR:	Glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体)
GRE:	Glucocorticoid response element (グルココルチコイド応答配列)
HER2:	Human epidermal growth factor receptor 2 (ヒト上皮増殖因子受容体 2 型)
IL-8:	Interleukin-8
LI:	Labeling index
NF $\kappa$ BRE:	NF $\kappa$ B response element (NF $\kappa$ B 応答配列)
OS:	Overall survival (全生存率)
PgR:	Progesterone receptor (プロゲステロン受容体)
P-TEFb:	Poitive transcription elongation factor b
qRT-PCR:	Quantitative real-time polymerase chain reaction (定量的リアルタイム PCR)
RPL13A:	Ribosomal protein L 13a
SGK1:	Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1
TNBC:	Triple-negative breast cancer (トリプルネガティブ乳癌)

## 1. 要約

トリプルネガティブ乳癌 (TNBC; Triple-negative breast cancer) は最も予後不良なサブタイプの乳癌であるが、現時点で推奨される全身療法は化学療法のみであり、治療標的となりうるバイオマーカーの同定が求められている。近年、TNBCにおけるグルココルチコイド受容体 (GR; Glucocorticoid receptor) やアンドロゲン受容体 (AR; Androgen receptor) の重要性が着目されているが、いずれも未解明の点が多い。そこで本研究では、TNBCにおけるGRの発現意義やグルココルチコイド (GC; Glucocorticoid) が細胞動態に与える影響、及びGRとARの相互作用を解明することを目的とした。

まずTNBC組織を用いて、GR, ARならびにGC代謝酵素である11 $\beta$ ヒドロキシ脱水素酵素タイプ1 (11 $\beta$ HSD1; 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1) 及び11 $\beta$ ヒドロキシ脱水素酵素タイプ2 (11 $\beta$ HSD2; 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2) の発現動態と臨床病理学的因子との関係を免疫組織化学的に検討した。その結果、TNBC症例においてGR陽性症例では陰性症例と比して臨床予後が有意に低下し、またAR陽性症例では陰性症例と比して組織学的グレード及びKi-67 labeling index (LI) の平均値が有意に低かった。さらにGR陽性TNBC症例では、ARの発現は再発リスクを有意に低下させた。

続いて上記の臨床検体で得られた結果の背景をさらに探求するため、乳癌細胞株を用いて、デキサメサゾン (DEX; Dexamethasone) 及びジヒドロテストステロン (DHT;

Dihydrotestosterone) が細胞増殖能や遊走能、GC 応答遺伝子の mRNA 発現に与える影響を検討した。その結果、GR/AR 共陽性 TNBC 細胞株である AR 導入 HCC38 において、DEX により有意に促進した細胞遊走能は DHT により抑制された。また DEX により有意に増加した Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1 (SGK1) の mRNA 発現も DHT により抑制された。

以上より、TNBC において GC が細胞遊走能を促進させることで、GR の発現が予後の低下と関係することを初めて示すことができた。さらにこの GC による予後の低下は、アンドロゲンを投与することで改善する可能性も示唆され、今後の臨床的な検討が期待される。

## 2. 研究背景

本邦において、乳癌の罹患数は女性の癌罹患数全体の 22.1% (2016 年)<sup>1)</sup>と女性の癌の中で最も頻度が高く、その罹患率は増加の一途をたどっている<sup>2)</sup>。年齢階級別罹患率は 30 歳代から上昇し始め、40 歳代後半では 239.7 (人口 10 万対)<sup>3)</sup>と他の癌と比べ若年者での罹患が多いことが特徴である。

乳癌診療においては、2000 年に Perou CM らが乳癌の遺伝子発現プロファイリングに基づく intrinsic subtype 分類を提唱し、薬物療法選択の指標として注目されてきた<sup>4)</sup><sup>5)</sup>。しかし遺伝子発現プロファイリングを乳癌症例全例に行うことは現実的ではないことから、免疫組織化学法を主体としたエストロゲン受容体 (ER; Estrogen receptor)、プロゲステロン受容体 (PgR; Progesterone receptor)、ヒト上皮増殖因子受容体 2 型 (HER2; Human epidermal growth factor receptor 2)、Ki-67 の発現状況に基づくサブタイプ分類が intrinsic subtype の代用として臨床で広く用いられている<sup>6-9)</sup>。このサブタイプ分類において、免疫組織化学的に ER, PgR, HER2 いずれも陰性の乳癌をトリプルネガティブ乳癌 (TNBC; Triple-negative breast cancer) と呼び、浸潤性乳癌の 10-20%程を占める<sup>10)</sup>最も予後不良な<sup>11, 12)</sup>タイプの乳癌である。乳癌の治療では手術の他に必要に応じて薬物療法 (内分泌療法、抗 HER2 療法、化学療法) が施行されるが、TNBC 患者では内分泌療法や抗 HER2 療法に対する感受性がないことから、現時点では化学療法のみが推奨されている。しかし化学療法は重篤な副作用を引き起こしうるため患者の負担は大きく、また薬剤耐性の獲得により十分な効果が得られなくなる TNBC 症例



も少なくない。よって、現在 TNBC において治療標的となりうるバイオマーカーの探求が求められている。

近年、TNBC における治療標的候補として、ER や PgR 以外のステロイドホルモン受容体が注目されている。特にアンドロゲン受容体 (AR; Androgen receptor) に関する研究は広く行われており<sup>13-17)</sup>、最新のメタ解析では、TNBC において AR 陽性症例では陰性症例に比して再発リスクが有意に低下することが報告されている<sup>15)</sup>。その一方で、AR 陽性症例では陰性症例に比して無病生存率や全生存率が有意に低下するという報告<sup>18)</sup>もなされており、TNBC におけるアンドロゲン作用に関する見解はいまだ一致していない。その要因として、付加的な転写因子が AR 作用を決定している可能性、例えば他のステロイドホルモン受容体と AR の相互作用の存在が示唆される。そのひとつとして、比較的多くの TNBC 症例で発現しており<sup>10, 19-23)</sup>、また他臓器で AR との相互作用が報告されている<sup>24, 25)</sup>グルココルチコイド受容体 (GR; Glucocorticoid receptor)が挙げられる。グルココルチコイド (GC; Glucocorticoid) は、GR と結合することで炎症や免疫反応だけでなく細胞増殖やアポトーシスにも関わる<sup>26)</sup>副腎皮質ホルモンである。その細胞内濃度は 11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素 (11 $\beta$ HSD; 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase) により調整され、11 $\beta$ HSD type 1 (11 $\beta$ HSD1) は主に不活性型 GC (コルチゾン) を活性型 GC (コルチゾール) へ変換し、11 $\beta$ HSD type 2 (11 $\beta$ HSD2) はその逆の反応に作用することが知られている (図 1)<sup>27)</sup>。すなわち局所での 11 $\beta$ HSD1 及び 11 $\beta$ HSD2 の発現動態により GC の濃度は調整されている。TNBC

を含む ER 陰性乳癌では、癌細胞における GR の発現は予後の低下と関係することが報告されている<sup>20, 22, 23, 28)</sup>。また細胞生存や上皮間葉転換、細胞接着等の癌に関連する経路を調整している GC 応答遺伝子が多数同定されており<sup>22, 23, 28-30)</sup>、これらの中でも特に Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1 (SGK1) に関する研究は多く行われている<sup>29-31)</sup>。さらに、*in vitro* や *in vivo* の実験により、TNBC においてデキサメサゾン (DEX; Dexamethasone) による GR の活性化は癌細胞のアポトーシスの抑制や増殖能の促進等により化学療法耐性を引き起こすことも報告されている<sup>30-33)</sup>。しかし、GC 自体が細胞動態、特に乳癌の進行に深く関わる癌細胞の増殖能や遊走能に及ぼす影響に関しては明らかにされていない。増殖能や遊走能は、多くの研究で探究されている新規治療法を開発するうえで有用な因子でもあり<sup>34-36)</sup>、TNBC において GC がこれらに及ぼす影響を解明することは重要と考えられる。

GR と AR の相互作用に関しては、腎臓では GR と AR の相互作用により AR の転写が抑制されるという報告<sup>24)</sup>、前立腺癌では AR の発現により GR の発現が抑制されるという報告<sup>25)</sup>がある。GR 及び AR は、通常ホモ二量体を形成して標的遺伝子プロモーター内に存在する各々のホルモン応答配列 (GRE; glucocorticoid response element, ARE; androgen response element) へ特異的に結合し転写を調整することはよく知られているが、GRE と ARE は共通の DNA 配列 (5'-AGAACA-3') を有していることから、GR と AR がヘテロダイマーを形成することで互いの作用を抑制するとも考えられている<sup>37)</sup>。しかし、TNBC における GR と AR の相互作用及びそれが細胞増殖能や遊走

能に及ぼす影響に関してはいまだ明らかにされていない。

### 3. 研究目的

本研究では、TNBCにおけるGRの発現意義及びGCが細胞動態に及ぼす影響や、GRとARの相互作用を明らかにすることを目的として、下記の検討を行った。

1. ヒト TNBC 組織を用いた GR, AR, 11 $\beta$ HSD1 及び 11 $\beta$ HSD2 の発現動態の免疫組織化学的検討、ならびに各因子及び GR と AR の相互作用が臨床病理学的因子や予後に及ぼす影響の検討
2. ヒト TNBC 細胞株らを用いた DEX 及びジヒドロテストステロン (DHT; Dihydrotestosterone) が細胞増殖能や遊走能に及ぼす影響、及び GC 応答遺伝子の発現に及ぼす影響の検討

## 4. 研究方法

### 4.1. ヒト乳癌組織を用いた実験

#### 4.1.1. 乳癌症例

東北大学病院 (n=34, 1998-2010 年)、相良病院 (n=52, 2007-2010 年)、JCHO 久留米総合病院 (n=45, 2005-2010 年) で外科的切除されたトリプルネガティブタイプの原発性浸潤性乳管癌患者計 131 例の 10%ホルマリン固定パラフィン包埋組織を免疫組織化学法に用いた。Stage IV 及び術前療法を施行された症例は除外した。用いた症例の臨床病理学的特徴は表 1 の通りである。なお本研究は、東北大学医学部医学系研究科倫理委員会 (2018-1-191)、相良病院倫理委員会 (15-2)、JCHO 久留米総合病院倫理委員会 (148) の承認を得て実施した。

#### 4.1.2. 免疫組織化学

Histofine SAB-PO kit (ニチレイバイオサイエンス、東京) を用い、ストレプトアビジンビオチン法にて免疫組織化学を施行した。切片を脱パラフィン処理した後、クエン酸バッファー (pH 6.0) を用いてオートクレーブ (121°C, 5 分) にて抗原賦活化処理を行った。その後、室温で 30 分間ブロッキングを行い、各濃度に希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。続いて、0.3%過酸化水素加メタノール溶液と室温で 30 分間反応させてペルオキシダーゼ活性を阻害した後、二次抗体及び酵素試薬と各々室温で 30 分間反応させてペルオキシダーゼ標識を行った。なお各反応間で 0.01 M リン

酸緩衝生理食塩水により洗浄を行った。最後に、3, 3'-diaminobenzidine 溶液にて可視化処理を行い、ヘマトキシリン溶液で対比染色を行った。なお 11 $\beta$ HSD2 の染色では抗原賦活化処理は行わなかった。本研究で用いた一次抗体の詳細は表 2 に示した。

GR 及び AR の評価は H-score<sup>38)</sup>を用い、核の染色強度 (0: 陰性, 1: 弱陽性, 2: 中等度陽性, 3: 強陽性) と各染色強度の割合を掛け合わせて 0 から 300 点に数値化した。

11 $\beta$ HSD1 及び 11 $\beta$ HSD2 の評価は modified H-score を用い、細胞質の染色強度 (0: 陰性, 1: 弱陽性, 2: 中等度陽性, 3: 強陽性) と 6 段階に分類した各染色強度の割合 (0.5: 0-1%, 6.75: 1-12.5%, 18.75: 12.5-25%, 37.5: 25-50%, 62.5: 50-75%, 87.5: 75-100%) を掛け合わせて 3 から 262.5 点に数値化した。いずれも全視野を評価し、過去に報告されている核内タンパク及び細胞質タンパクの免疫組織化学の評価法<sup>20, 39, 40)</sup>を参考に、10 点以上を陽性とした。Ki-67 はホットスポットの核内陽性像を、labeling index (LI)<sup>41, 42)</sup>を用いて評価した。

## 4.2. ヒト乳癌培養細胞を用いた実験

### 4.2.1. 培養細胞

本研究では、表 3 に示す 4 種の TNBC 細胞株及び 1 種の HER2 陽性 ER 陰性細胞株を用いた。

#### 4.2.2. 細胞培養方法

MDA-MB-231 及び MDA-MB-453 は、10%ウシ胎児血清 (FBS: Fetal bovine serum; Biosera, Boussens, France) 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を添加した Leibovitz's L-15 Medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて、CO<sub>2</sub> 非供給下 37°C インキュベーターで培養した。HCC38 は 10%FBS 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) を、MFM-223 は 10% FBS 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した Minimum Essential Medium (Life technologies) を用いて、5% CO<sub>2</sub> 供給下 37°C 湿潤インキュベーターで培養した。SUM185PE は 5% FBS 及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシン、1 µg/ml ヒドロコルチゾン (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)、5 µg/ml インスリン (Sigma-Aldrich)、2 mM L-グルタミン (Life Technologies) を添加した Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma-Aldrich) を用いて、5% CO<sub>2</sub> 供給下 37°C 湿潤インキュベーターで培養した。

#### 4.2.3. アンドロゲン受容体導入細胞株の作製

本研究では、AR を導入した HCC38 を作製した。pcDNA3.1 (-) ベクター (Invitrogen) に AR 遺伝子を挿入したプラスミドを作製し、DEX (和光純薬工業、大阪) 及び DHT (東京化成工業、東京) を添加する 12 時間前に Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) とともに HCC38 に導入した。コントロール細胞には

pcDNA3.1 (-) ベクターのみを導入した。なお本研究は遺伝子実験センターの承認を得て実施した (2017 医組換-167)。

#### 4.2.4. 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction)

6-well プレートに播種した培養細胞に TRI reagent (コスモバイオ、東京) 1 ml を添加し、室温で5分間浸透させた後にピペッティングしてチューブに回収した。その後、フェノールクロロホルム法及びエタノール沈殿法にて total RNA を抽出し、NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定した。

続いて QuantiTect Reverse Transcriptional Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて逆転写反応を行った。各サンプルから抽出した RNA 1  $\mu$ g に gDNA Wipeout Buffer 2  $\mu$ L を加え、さらに総量が 14  $\mu$ L になるよう RNase-free water を加えた。サーマルサイクラー (Bioer Technology, Hongzhou, China) を用いて、42°C で2分間インキュベートし、genomic DNA を除去した。4°C まで冷却した後、各サンプルの反応液に逆転写反応液 (Quantiscript Reverse Transcriptase 1  $\mu$ L, RT Buffer 4  $\mu$ L, RT Primer Mix 1  $\mu$ L) を加え、42°C で15分間、95°C で3分間インキュベートし、complementary DNA (cDNA) を作製した。

定量的リアルタイム PCR は FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて行った。各サンプルの cDNA 1  $\mu$ L に PCR 反応液 (Fast



Start Essential 10  $\mu$ L, Primer Mix 1  $\mu$ L, RNase-free Water 8  $\mu$ L) を加え、LightCycler 96 System (Roche Diagnostics) を用いて 95°C で 15 分間反応させた後、表 4 に示した各プライマーを 95°C で 10 秒間、63°C で 10 秒間、72°C で 15 秒間 (50 サイクル) 反応させた。Ribosomal protein L 13a (RPL13A) を内因性コントロールとして用い、各々 3 サンプルの定量値の平均値及び標準偏差を算出した。

#### 4.2.5. ウェスタンブロッティング

60 mm ディッシュに播種した細胞に PBS を 1 ml 添加し、セルスクレイパーを用いて細胞をチューブに回収した。4°C, 3000 rpm, 5 分間遠心後に上清を除去し、M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) と Halt Protease Inhibitor Cocktail (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) の混合液を加え、タンパクを抽出した。4°C, 13000 rpm, 10 分間遠心後に上清を回収し、Protein Assay Rapid Kit (和光純薬工業) を用いて iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて濃度を測定した。

20  $\mu$ g 相当の各サンプルに Sample Buffer Solution (和光純薬工業) と 2-Mercaptoethanol (和光純薬工業) の混合液を等量加え、熱処理 (100°C, 5 分間) した後に SDS-PAGE により分離した。泳動後に Immobilon Transfer Membrane (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) にタンパクを転写した。5%skim milk を用いて 1 時間ブロッキングした後、各濃度に希釈した一次抗体を加え 4°C で一晩反応させた。その後、ペルオキシダーゼ

標識された二次抗体を加えて室温で 1 時間反応させ、さらに ECL-Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を加え、ChemiDoc XRS+System (Bio-Rad Laboratories) を用いてバンドを検出した。なお各反応間に界面活性剤を含むトリス緩衝生理食塩水で洗浄を行った。Anti- $\beta$ -actin antibody (Proteintech, Rosemont, IL, USA) を内因性コントロールとして用いた。本研究で用いた一次抗体の詳細は表 2 に示した。

#### 4.2.6. 細胞増殖実験

細胞増殖実験には、WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] assay (Cell Counting Kit-8; 同仁化学研究所、熊本) を用いた。

培養細胞を 10%チャコール処理済み FBS 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したフェノールレッド非含有培地で 48 時間培養した後に、96-well プレートに播種した。その 24 時間後に DEX または DHT を添加し、さらに 72 時間後に Cell Counting Kit-8 を添加し、iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories) にて 450 nm における吸光度を測定して生細胞数を評価した。各々 6 サンプルの平均値及び標準偏差を算出した。

#### 4.2.7. 細胞遊走実験

細胞遊走実験には wound healing assay を用いた。

MDA-MB-231 及び HCC38 は、1%チャコール処理済み FBS 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したフェノールレッド非含有培地とともに 6-well プレートに  $5 \times 10^5$  /ml の割合で播種した。MDA-MB-453 は、10%チャコール処理済み FBS 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したフェノールレッド非含有培地とともに 6-well プレートに  $2 \times 10^6$  /ml の割合で播種した。72 時間後に各培養細胞を DEX 及び DHT とともに、24-well プレートにおいたインサート (Culture-Insert; Ibidi, GmbH, Munich, Germany) の中に  $5 \times 10^5$  /ml または  $2 \times 10^6$  /ml の割合で播種した。48 時間後にインサートを除去し、20 時間後に間隙の長さの変化率を 9 ヶ所 (全体を 3 視野にわけ、各々 3 ヶ所) で測定して、平均値及び標準偏差を算出した (図 2)。

#### 4.2.8. グルココルチコイド応答遺伝子の mRNA 発現

代表的な GR 依存性のアップレギュレーション遺伝子<sup>22, 28-30, 43, 44)</sup>である SGK1 (Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1) 及び GR のダウンレギュレーション遺伝子<sup>44)</sup>である IL-8 (Interleukin-8) の mRNA 発現を評価した。

培養細胞を 10%チャコール処理済み FBS 及び 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したフェノールレッド非含有培地で 48 時間培養した後に、6-well プレートに播種した。その 24 時間後に DEX 及び DHT を添加し、さらに 24 時間後に cDNA を抽出した。各々 3 サンプルの定量値の平均値及び標準偏差を算出した。

### 4.3. 統計解析

統計解析には JMP Pro 14.0.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。ヒト乳癌組織を用いた実験においては、各発現動態と臨床病理学的因子との関係はステューデントの  $t$  検定または  $\chi^2$  検定により解析した。生存時間は Kaplan-Meier 法により解析を行い、ログランク検定により評価した。ヒト乳癌培養細胞を用いた実験では、Dunnett の検定により解析した。本研究では、 $p < 0.05$  の場合に有意差があるものと判断した。

## 5. 研究結果

### 5.1. TNBC 組織における GR 及び AR の発現意義

#### 5.1.1. TNBC 組織における GR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 の発現動態と臨床病理学的

##### 因子との関係

ヒト TNBC 組織を用いて、GR, AR, 11 $\beta$ HSD1 及び 11 $\beta$ HSD2 の免疫組織化学を行った。陽性コントロールとして、GR 及び 11 $\beta$ HSD2 は腎臓、AR は前立腺癌、11 $\beta$ HSD1 は肝臓を用いた。乳癌細胞では GR 及び AR は核に、11 $\beta$ HSD1 及び 11 $\beta$ HSD2 は細胞質に優位に陽性像が認められた（図 3）。

GR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 の陽性率は、各々 60.3% (79/131), 36.6% (48/131), 89.3% (117/131), 47.3% (62/131)であった（表 5）。

次に、癌細胞における各々の因子の発現動態と臨床病理学的因子（年齢、腫瘍径、リンパ節転移、病理病期、組織学的グレード、リンパ管侵襲、Ki-67 LI）との関係（表 6, 表 7）、及び無病生存率または全生存率との関係（図 4）を検討した。AR 陽性症例では陰性症例と比して、年齢が有意に高く ( $p = 0.003$ )、また組織学的グレード ( $p < 0.0001$ ) 及び Ki-67 LI の平均値 ( $p = 0.002$ ) が有意に低かった。11 $\beta$ HSD2 陽性症例でも陰性症例と比して、組織学的グレード ( $p = 0.02$ ) 及び Ki-67 LI の平均値 ( $p = 0.02$ ) が有意に低かった。しかし、生存期間分析ではこれらの発現動態との間に有意な差は認められなかった。一方、GR の発現動態は、いずれの臨床病理学的因子とも有意な関係は示さなかったが、GR 陽性症例では陰性症例と比して、無病生存率 ( $p = 0.04$ ) 及

び全生存率 ( $p = 0.03$ ) が有意に低下していた。なお、11 $\beta$ HSD1 の発現動態はいずれの臨床病理学的因子とも有意な関係は示さず、また生存期間分析でも有意な差は認められなかった。

### 5.1.2. GR 陽性または GR 陰性 TNBC 組織における AR の発現動態と臨床病理学的

#### 因子との関係

本検討では、免疫組織化学的に GR の発現と AR の発現の間には有意な正の関係 ( $p = 0.008$ ) を認めた (表 6)。また Spearman の相関係数は 0.2732 であった。そこで、TNBC における GR と AR の相互作用をさらに追究するために、検索した TNBC 症例を GR 陽性症例と GR 陰性症例にわけ、各々 AR の発現動態と臨床病理学的因子及び無病生存率との関係を検討した。その結果、GR 陽性 TNBC 症例において、AR 陽性症例では陰性症例と比して組織学的グレード ( $p = 0.0006$ ) 及び Ki-67 LI の平均値 ( $p = 0.0001$ ) が有意に低下し、無病生存率 ( $p = 0.04$ ) は有意に上昇した (図 5)。一方、GR 陰性 TNBC 症例においては、AR 陽性症例では陰性症例と比して組織学的グレードは有意に低下したが ( $p = 0.007$ )、Ki-67 LI の平均値及び無病生存率との間に有意な関係は認められなかった (図 6)。

### 5.1.3. AR 陽性または AR 陰性 TNBC 組織における GR の発現動態と臨床病理学的

#### 因子との関係

続いて、検索した TNBC 症例を AR 陽性症例と AR 陰性症例にわけ、各々 GR の発現動態と臨床病理学的因子及び無病生存率との関係を検討した。その結果、AR 陽性 TNBC 症例において、GR の発現と組織学的グレード、Ki-67 LI の平均値、無病生存率との間にはいずれも有意な関係は認められなかった（図 7）。一方、AR 陰性 TNBC 症例においては、GR 陽性症例では陰性症例と比して無病生存率は有意に低下したが ( $p = 0.01$ )、組織学的グレード及び Ki-67 LI の平均値との間に有意な関係は認められなかった（図 8）。

### 5.1.4. ヒト乳癌組織を用いた実験結果の概要

ヒト乳癌組織を用いた実験結果の概要を表 8 に示す。特記すべき点としては、予後不良であった GR 陽性 TNBC において、AR が発現することで予後の改善を認めたことである。

## 5.2. 乳癌細胞株における DEX 及び DHT の生物学的作用

### 5.2.1. 乳癌細胞株における GR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 の発現

上記の免疫組織化学で得られた結果の機序をさらに探究するため、続いて乳癌細胞株を用いて実験を行った。まず、実験に適した細胞株を選定するために、5 種の乳癌

細胞株における GR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 の mRNA 及びタンパクの発現を qRT-PCR 及びウェスタンブロッティングにより検討した(図 9-A, B)。MDA-MB-231 及び HCC38 では、GR の発現は mRNA, タンパクともに高度であったが、AR の発現はほとんど認めなかった。SUM185PE 及び MFM-223 は GR の発現は軽度だが、AR の発現は中等度であった。一方、MDA-MB-453 では GR, AR とともに高度に発現していた。11 $\beta$ HSD1 は、陽性コントロールとして用いた NCI-H295R では高度なタンパク発現を認めたが、乳癌細胞株ではいずれも発現を認めなかった。11 $\beta$ HSD2 は SUM185PE でのみ高度に発現していた。

これらの発現パターンより、GR が高度に発現している MDA-MB-231 及び HCC38 を用いて以降の実験を施行することとした。また、GR/AR 共陽性 TNBC 細胞株として AR 導入 HCC38 を作製した(図 9-C)。さらに、GR と AR の相互作用をより詳しく調べるにあたり適した TNBC 細胞株が他になかったため、HER2 陽性 ER 陰性細胞株(図 9-D)ではあるが GR/AR 共陽性を示した MDA-MB-453 も用いることとした。

### 5.2.2. 乳癌細胞株における DEX 及び DHT が細胞増殖能に及ぼす影響

DEX が細胞増殖能に及ぼす影響を、WST8 assay を用いて検討した。MDA-MB-231 において、10 nM の DEX 添加時にコントロールと比して有意な細胞増殖能の促進を認めた ( $p = 0.003$ ; 図 10-A)。ただし有意な変化は得られたもののその増加率は 15%とわずかであり、機能的な意義は不明であった。一方、HCC38 では有意な変化は認め



られなかった (図 10-C)。また MDA-MB-453 では、1 nM 及び 10 nM の DEX 添加時にコントロールと比して有意な細胞増殖能の促進を認めたが (1 nM:  $p = 0.03$ , 10 nM:  $p = 0.04$ ; 図 10-D)、その増加率はいずれも 10%とわずかであった。

続いて、DEX 投与時に変化を認めた MDA-MB-231 及び MDA-MB-453 を用いて、DHT 投与時の細胞増殖能の変化を検討した。MDA-MB-231 では有意な変化は認められなかった (図 10-B)。一方、MDA-MB-453 では 1 nM 及び 10 nM の DHT 添加時にコントロールと比して有意な細胞増殖能の促進を認めたが (1 nM:  $p = 0.006$ , 10 nM;  $p = 0.006$ ; 図 10-E)、その増加率はいずれも 13%とわずかであった。

### 5.2.3. 乳癌細胞株における DEX 及び DEX/DHT が細胞遊走能に及ぼす影響

DEX 及び DEX/DHT が細胞遊走能に及ぼす影響を、wound healing assay を用いて検討した。MDA-MB-231 において、DEX 単独投与時に濃度依存性に有意な細胞遊走能の促進を認めたが (100 pM;  $p = 0.02$ , 10 nM;  $p = 0.001$ ; 図 11-A)、DEX/DHT 共投与時はコントロールと比して有意な変化は認められなかった (図 11-B)。AR 導入 HCC38 では、DEX 単独投与時に濃度依存性に有意な細胞遊走能の促進を認め (100 pM;  $p = 0.02$ , 10 nM;  $p = 0.001$ ; 図 11-C)、その促進は DHT により抑制された (図 11-D)。MDA-MB-453 でも、DEX 単独投与時に濃度依存性に有意な細胞遊走能の促進を認めたが (10 nM:  $p = 0.01$ ; 図 11-E)、DHT はその促進に影響を与えなかった (図 11-F)。

なお DHT 単独では、いずれの細胞株においてもその細胞遊走能に影響は見られな

かった (1nM, 10nM; 32 時間)。

#### 5.2.4. 乳癌細胞株における DEX 及び DEX/DHT が GC 応答遺伝子の mRNA 発現に及ぼす影響

TNBC における GR と AR の相互作用をさらに検討するため、DEX 単独投与時及び DEX/DHT 共投与時の SGK1 の mRNA 発現の変化を調べた。MDA-MB-231 において、DEX 単独投与後 24 時間での SGK1 の mRNA 発現は有意に増加したが ( $p = 0.04$ )。DEX/DHT 共投与時はコントロールと比して有意な変化は認められなかった (図 12-A)。AR 導入 HCC38 では、DEX 単独投与後 24 時間での mRNA 発現は有意に増加し ( $p = 0.02$ )、その増加は DHT により抑制された (図 12-B)。48 時間後の mRNA 発現は有意な変化が認められなかったものの、同様の傾向を示した (図 12-C)。MDA-MB-453 では、DEX 単独投与後 24 時間での mRNA 発現は有意に増加し ( $p = 0.004$ )、その増加は DHT により抑制された (図 12-D)。

さらに、AR 導入 HCC38 において、IL-8 の mRNA 発現の変化も調べた。DEX 単独投与後 48 時間での IL-8 の mRNA 発現は有意に減少したが ( $p = 0.04$ )、DHT はその変化に対し影響を与えなかった (図 13-B)。24 時間後の IL-8 の mRNA 発現はコントロールを含めて安定した結果が得られず、各グループの発現のばらつきが大きかった (実験自体の再現性は認められた)。したがって、24 時間後の IL-8 の発現には有意な変化が認められなかったと考えられる。なお、24 時間後の各グループ間の IL-8 の

mRNA 発現は 48 時間後と同様の傾向を示した (図 13-A)。

#### 5.2.5. ヒト乳癌細胞株を用いた実験結果の概要

ヒト乳癌細胞株を用いた実験結果の概要を表 9 に示す。特記すべき点は 2 点ある。

一つ目は、MDA-MB-231, HCC38, MDA-MB-453 の 3 種の細胞株において DEX による細胞遊走能の上昇を認めたことである。二つ目としては、GR/AR 共陽性 TNBC 細胞株である AR 導入 HCC38 において、DEX による遊走能の上昇を DHT が抑制し、また DEX による SGK1 の mRNA 発現上昇を DHT が抑制した一方、DEX による IL-8 の mRNA 発現減少に対し DHT は影響を与えなかったことが挙げられる。

## 6. 考察

本研究では、まず TNBC 患者の癌組織における GR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 の免疫組織化学的発現を調べた。その結果 GR の陽性率は 60.3%であった。一方、これまで TNBC を含む ER 陰性乳癌での GR 陽性率に関しては 0-84%と様々な報告がなされている<sup>10, 19-21, 45)</sup>。このように報告された結果にばらつきがみられるのは、抗体や評価法、カットオフ値、標本の状態、モレキュラーサブタイプ、患者の年齢や人種等の違いによると考えられている<sup>19, 28)</sup>。また本研究では、既報告と同様に<sup>20, 22, 23)</sup>GR の発現は予後の低下と有意な関係を示したが、GR の発現動態と臨床病理学的因子の間にはいずれも有意な関係は認められなかった。これまでに GR の発現動態と臨床病理学的因子との関係に関して報告しているのは Abduljabbar R らのみであり、彼らもまた GR の発現は予後の低下と有意に関係するが、核異型度の他には有意な関係を有する臨床病理学的因子を認めないことを報告している<sup>20)</sup>。なお彼らの検討では、GR 陽性症例では陰性症例と比して核異型度が有意に低いという結果であったが<sup>20)</sup>、予後の低下との関連に関しては触れられていない。

続いて、TNBC における GC の作用をさらに探求するために GC 代謝に着目した。腫瘍内の GC 濃度は、11 $\beta$ HSD1 と 11 $\beta$ HSD2 のバランスにより調整されていることはよく知られている<sup>27)</sup>。11 $\beta$ HSD1 は双方向的な酵素であるが、主に活性型 GC であるコルチゾールまたはコルチコステロンを生成するための酸化還元酵素として作用する<sup>27)</sup>。一方、11 $\beta$ HSD2 は一方向性に不活性型の GC を産生するよう作用する<sup>27)</sup>。本研究

では、11 $\beta$ HSD2 陽性症例では陰性症例と比して組織学的グレードや Ki-67 LI の平均値が有意に低下することを初めて示すことができた。一方癌細胞における 11 $\beta$ HSD1 の発現動態と臨床病理学的因子との間に有意な関係は認めなかったことも含めて考えると、腫瘍内の活性型 GC 濃度は 11 $\beta$ HSD1 の高発現よりも 11 $\beta$ HSD2 の低発現により規定されることが示唆された。このように 11 $\beta$ HSD2 が腫瘍局所での活性型 GC 濃度を規定していると考ええると、11 $\beta$ HSD2 陰性症例における悪性度上昇は、活性型 GC と結合する GR 陽性症例における臨床予後の低下と矛盾しない。しかし、本研究では腫瘍局所の GC 濃度を実際に測定して酵素の発現と比較したわけではないことから、これら酵素の意義や受容体との関連を明らかにするためにはさらなる検討が必要であると考えられる。

GR と AR の相互作用に関しては、これまでに TNBC における報告はなされていない。しかし、ER 陰性乳癌においては GR と AR の遺伝子発現の間の相関は弱く（相関係数 = 0.0338）、AR の発現は GR の予後に影響を与えない可能性が高いと Pan D らが報告している<sup>28)</sup>。本研究でも GR と AR の発現に有意な関係は認めたもののその相関係数は低かった（Spearman の相関係数 = 0.2732）。しかし、GR 陽性 TNBC において AR の発現は悪性度の低下や予後の上昇と有意に関係すること、また AR 陰性 TNBC において GR の発現は予後の低下と有意に関係する一方で AR 陽性 TNBC においてはそれらの間に有意な関係を認めないことが初めて明らかになった。これらの結果より、GR の作用を AR が妨げるという相互作用の存在が示唆された。

続いてこれらの免疫組織化学的検討の結果をもとに、*in vitro* の実験を施行した。

GC 応答遺伝子として多くの浸潤関連遺伝子が知られている<sup>23)</sup>が、TNBC において GC が浸潤や遊走を直接誘導するかどうかは知られていない。本研究では、TNBC 細胞株において DEX が濃度依存性に細胞遊走能を促進させることを初めて明らかにした。

一方で、DEX が細胞増殖能に与える直接的な影響は比較的低いと考えられた。よって TNBC の悪性度に対する GC-GR シグナルの関与を明らかにするために、TNBC に特異的な応答遺伝子の探求等さらなる研究が必要である。

GR と AR の相互作用に関しては、MDA-MB-231 及び AR 導入 HCC38 を用いた実験結果は、アンドロゲンシグナルが GC シグナルによる TNBC の悪性化を抑制するという免疫組織化学の結果と一致していた。しかし MDA-MB-453 における DEX/DHT に対する細胞遊走能の変化は、同じく GR/AR 共発現細胞株である AR 導入 HCC38 とは異なるものであった。また同細胞における DHT に対する細胞増殖能の変化も予想と反するものであったが、これに関しては他にも同様な結果が報告されている<sup>46-49)</sup>。このように MDA-MB-453 において特徴的な結果が得られた理由として、報告されている AR と HER2 のクロストーク<sup>49,50)</sup>が関与している可能性が考えられる。これは、AR の活性化により細胞内で HER2 発現が誘導され、それにより extracellular signal-regulated kinase がリン酸化されて細胞増殖能が促進されるというものである。これらのクロストークが細胞遊走能に影響を与えることが示唆されるが、HER2 タイプにおける GR と AR の相互作用の解明に関してはさらなる研究が必要である。

続いて、TNBCにおけるGRとARの相互作用機序をさらに明らかにするために、DEX単独投与またはDEX/DHT共投与時のSGK1及びIL-8のmRNA発現の変化に着目した。SGK1はGRとARの相互作用の研究に用いられることのある<sup>51)</sup>遺伝子のひとつである。その結果、GR/AR共発現細胞株において、SGK1のmRNA発現はDEX単独投与により増加し、その増加はDHTにより抑制された。一方IL-8のmRNA発現はDEX単独投与により抑制されたが、DHTはその変化に対し影響を与えなかった。このDEX/DHT共投与時の発現変化の相違は、GRによるこれらの遺伝子発現調節機序の相違によるものと考えられる。SGK1の発現は、GRがGREに結合することにより促進する<sup>43)</sup>。一方、IL-8もGREを有しているものの、主にGRがPositive transcription elongation factor b (P-TEFb) という転写伸長因子と競合してNFκB応答配列 (NFκBRE: NFκB response element) に結合することで発現が抑制される<sup>52)</sup>。そこで本研究結果と合わせて考えると、SGK1ではARがGRと競合してGREに結合することでGRの作用を抑制する一方、IL-8ではARはGRと競合しないために影響を与えなかったことが示唆される (図14)。つまり、標的遺伝子のGRE依存性の転写レベルにおけるGRとARの相互作用が、TNBCにおいてGRにより促進した遊走能をARが抑制することに関与している可能性が考えられる。しかし、GRシグナルの応答遺伝子としてよく知られるSGK1及びIL-8は、このようにGRとARの相互作用の機序の解明には役立つが、本研究の他の結果を支持するような機能、すなわちTNBCにおける遊走能や悪性度に関わるという機能は知られていない。そこでTNBCにおけるSGK1及びIL-8

の機能の探索、及び直接遊走に關与する TNBC 特異的な GR 応答遺伝子の同定が必要である。また、GR と AR 共通の転写共役因子として nuclear receptor coactivator 1 ら多くの因子が報告されている<sup>53)</sup>。リガンドと結合した AR がこれら転写共役因子との結合を占めることで、GR による転写作用が抑制されるという機序も考えられる。

本研究結果を臨床に応用することで、TNBC 患者の化学療法を最適化できる可能性が期待される。GR アゴニストである DEX は化学療法による嘔気や食欲減退、倦怠感、アレルギー反応等の副作用を軽減させる効果があるため臨床の現場ではよく使用されている<sup>19, 30, 54, 55)</sup>が、一方で骨粗鬆症や消化性潰瘍、糖尿病等の多様な副作用を有する<sup>56)</sup>薬剤であり、また化学療法による癌細胞のアポトーシスの阻害等により化学療法耐性を引き起こすことも示されている<sup>30-33)</sup>。近年、DEX と GR アンタゴニストであるミフェプリストンとの併用が化学療法耐性 GR 陽性 TNBC 患者における効果的な戦略として報告されており<sup>10, 23)</sup>、これはナブパクリタキセルとミフェプリストンを併用するという Phase-I トライアルでも効果は示されている<sup>57)</sup>。ナブパクリタキセルは通常重篤な嘔気や倦怠感、アレルギー反応を引き起こさず、DEX が投与されないことが多い<sup>57-59)</sup>ため問題はないと考えられるが、他の多くの抗癌剤では DEX が前投与されることが多く、ミフェプリストン投与により DEX の効果が低下する可能性が危惧される。すなわち、化学療法の効果を最適化するためにミフェプリストンを投与すると副作用が重篤化する恐れが生じ、一方有害事象を軽減させるためにミフェプリストンを投与しなければ化学療法の効果が減少する恐れが生じるため、化学療法の効果と有



害事象をともにコントロールすることが難しいと考えられる。そこで本研究結果をもとに、TNBC 患者において GR だけでなく AR の発現も評価し、GR 陽性 AR 陽性症例では AR アゴニストを投与することで、DEX の効果を軽減させることなく悪性度を低下せうることが期待される。一方 GR 陽性 AR 陰性症例では、慎重な経過観察または DEX の効果が打ち消される可能性も踏まえたうえでの GR アンタゴニストの投与が望ましいと考えられる（図 15）。なおミフェプリストンは人工妊娠中絶やクッシング病に対して世界的にはよく使用されている薬剤であるが、膣からの多量出血等の重大な副作用が起きうる<sup>60)</sup>ことから本邦では未承認である。一方 AR アゴニストに関しては、ダナゾールが子宮内膜症に対して本邦でも使用されているが、血栓症や劇症肝炎等の重大な副作用が起きうる<sup>61)</sup>ため、使用の際には十分な注意が必要と考えられる。これらの副作用に十分配慮し、適応患者を選定することが今後の課題である。

## 7. 結論

TNBC 患者において、GC が癌細胞の遊走能を促進させることにより、GR の発現が予後の低下と関係することを初めて示すことができた。また、この GR の発現による予後の低下は、AR の発現および作用により改善する可能性が示唆され、今後の臨床的な検討が期待される。

## 8. 文献

1. 厚生労働省「全国がん罹患数 2016 年速報」
2. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」
3. 日本乳癌学会: 乳癌診療ガイドライン 2 疫学・診断編 2018 年版. 金原出版株式会社. 2018 年
4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000;406:747-52.
5. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:10869-74.
6. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol. 2011;22:1736-47.
7. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Ann Oncol. 2013;24:2206-23.
8. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Ann Oncol. 2015;26:1533-46.

9. Curigliano G, Burstein HJ, E PW, et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. *Ann Oncol.* 2019;30:1181.
10. Skor MN, Wonder EL, Kocherginsky M, et al. Glucocorticoid receptor antagonism as a novel therapy for triple-negative breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2013;19:6163-72.
11. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, et al. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer treatment reviews.* 2010;36:206-15.
12. de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, et al. Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2011;137:183-92.
13. McNamara KM, Yoda T, Miki Y, et al. Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumors: its correlation with tumor cell proliferation. *Cancer Sci.* 2013;104:639-46.
14. McNamara KM, Yoda T, Takagi K, et al. Androgen receptor in triple negative breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2013;133:66-76.
15. Wang C, Pan B, Zhu H, et al. Prognostic value of androgen receptor in triple negative breast cancer: A meta-analysis. *Oncotarget.* 2016;7:46482-91.
16. Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Jindal S, et al. The Magnitude of Androgen

Receptor Positivity in Breast Cancer is Critical for Reliable Prediction of Disease Outcome.

Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.

2018.

17. Sunar V, H TD, Sarici F, et al. Association between androgen receptor status and prognosis in triple negative breast cancer. Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology. 2018;23:1325-30.

18. Choi JE, Kang SH, Lee SJ, et al. Androgen receptor expression predicts decreased survival in early stage triple-negative breast cancer. Annals of surgical oncology. 2015;22:82-9.

19. Belova L, Delgado B, Kocherginsky M, et al. Glucocorticoid receptor expression in breast cancer associates with older patient age. Breast cancer research and treatment. 2009;116:441-7.

20. Abduljabbar R, Negm OH, Lai CF, et al. Clinical and biological significance of glucocorticoid receptor (GR) expression in breast cancer. Breast cancer research and treatment. 2015;150:335-46.

21. Baker GM, Murphy T, Block T, et al. Development and validation of an immunohistochemistry assay to assess glucocorticoid receptor expression for clinical trials of mifepristone in breast cancer. Cancer Manag Res. 2015;7:361-8.

22. Chen Z, Lan X, Wu D, et al. Ligand-dependent genomic function of glucocorticoid

receptor in triple-negative breast cancer. *Nat Commun.* 2015;6:8323.

23. West DC, Kocherginsky M, Tonsing-Carter EY, et al. Discovery of a Glucocorticoid Receptor (GR) Activity Signature Using Selective GR Antagonism in ER-Negative Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2018;24:3433-46.

24. Burnstein KL, Maorino CA, Dai JL, et al. Androgen and glucocorticoid regulation of androgen receptor cDNA expression. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;115:177-86.

25. Xie N, Cheng H, Lin D, et al. The expression of glucocorticoid receptor is negatively regulated by active androgen receptor signaling in prostate tumors. *International journal of cancer.* 2015;136:E27-38.

26. Baschant U, Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2010;120:69-75.

27. Krozowski Z, Li KX, Koyama K, et al. The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 1999;69:391-401.

28. Pan D, Kocherginsky M, Conzen SD. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer research.* 2011;71:6360-70.

29. Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, et al. Glucocorticoid receptor-mediated

protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:16649-54.

30. Wu W, Chaudhuri S, Brickley DR, et al. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer research*. 2004;64:1757-64.

31. Wu W, Pew T, Zou M, et al. Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280:4117-24.

32. Pang D, Kocherginsky M, Krausz T, et al. Dexamethasone decreases xenograft response to Paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis. *Cancer biology & therapy*. 2006;5:933-40.

33. Li Z, Dong J, Zou T, et al. Dexamethasone induces docetaxel and cisplatin resistance partially through up-regulating Kruppel-like factor 5 in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8:11555-65.

34. Tang Z, Ding S, Huang H, et al. HDAC1 triggers the proliferation and migration of breast cancer cells via upregulation of interleukin-8. *Biological chemistry*. 2017;398:1347-56.

35. Zhang Y. *Ganoderma lucidum* (Reishi) suppresses proliferation and migration of breast cancer cells via inhibiting Wnt/beta-catenin signaling. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;488:679-84.

36. Kong Q, Qiu M. Long noncoding RNA SNHG15 promotes human breast cancer proliferation, migration and invasion by sponging miR-211-3p. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;495:1594-600.
37. Chen S, Wang J, Yu G, et al. Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:14087-92.
38. McCarty KS, Jr., Miller LS, Cox EB, et al. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1985;109:716-21.
39. Suzuki T, Miki Y, Moriya T, et al. 5Alpha-reductase type 1 and aromatase in breast carcinoma as regulators of in situ androgen production. *International journal of cancer*. 2007;120:285-91.
40. McNamara KM, Yoda T, Miki Y, et al. Androgen receptor and enzymes in lymph node metastasis and cancer reoccurrence in triple-negative breast cancer. *Int J Biol Markers*. 2015;30:e184-9.
41. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103:1656-64.
42. Tamaki K, Ishida T, Tamaki N, et al. Analysis of clinically relevant values of Ki-67



labeling index in Japanese breast cancer patients. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*. 2014;21:325-33.

43. Itani OA, Liu KZ, Cornish KL, et al. Glucocorticoids stimulate human *sgk1* gene expression by activation of a GRE in its 5'-flanking region. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2002;283:E971-9.

44. So AY, Chaivorapol C, Bolton EC, et al. Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS genetics*. 2007;3:e94.

45. Buxant F, Engohan-Aloghe C, Noel JC. Estrogen receptor, progesterone receptor, and glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue, breast in situ carcinoma, and invasive breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18:254-7.

46. Hall RE, Birrell SN, Tilley WD, et al. MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 1994;30a:484-90.

47. Birrell SN, Bentel JM, Hickey TE, et al. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1995;52:459-67.

48. Doane AS, Danso M, Lal P, et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene*. 2006;25:3994-4008.

49. Naderi A, Hughes-Davies L. A functionally significant cross-talk between androgen receptor and ErbB2 pathways in estrogen receptor negative breast cancer. *Neoplasia*. 2008;10:542-8.
50. Chia KM, Liu J, Francis GD, et al. A feedback loop between androgen receptor and ERK signaling in estrogen receptor-negative breast cancer. *Neoplasia*. 2011;13:154-66.
51. Isikbay M, Otto K, Kregel S, et al. Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer. *Hormones & cancer*. 2014;5:72-89.
52. Luecke HF, Yamamoto KR. The glucocorticoid receptor blocks P-TEFb recruitment by NFkappaB to effect promoter-specific transcriptional repression. *Genes & development*. 2005;19:1116-27.
53. Lempiainen JK, Niskanen EA, Vuoti KM, et al. Agonist-specific Protein Interactomes of Glucocorticoid and Androgen Receptor as Revealed by Proximity Mapping. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2017;16:1462-74.
54. Gennari A, Salvadori B, Tognoni A, et al. Rapid intravenous premedication with dexamethasone prevents hypersensitivity reactions to paclitaxel. *Ann Oncol*. 1996;7:978-9.
55. Lin KT, Wang LH. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment. *Steroids*. 2016;111:84-8.
56. デカドロロン錠 添付文書
57. Nanda R, Stringer-Reasor EM, Saha P, et al. A randomized phase I trial of

nanoparticle albumin-bound paclitaxel with or without mifepristone for advanced breast cancer. Springerplus. 2016;5:947.

58. Yamamoto Y, Kawano I, Iwase H. Nab-paclitaxel for the treatment of breast cancer: efficacy, safety, and approval. OncoTargets and therapy. 2011;4:123-36.

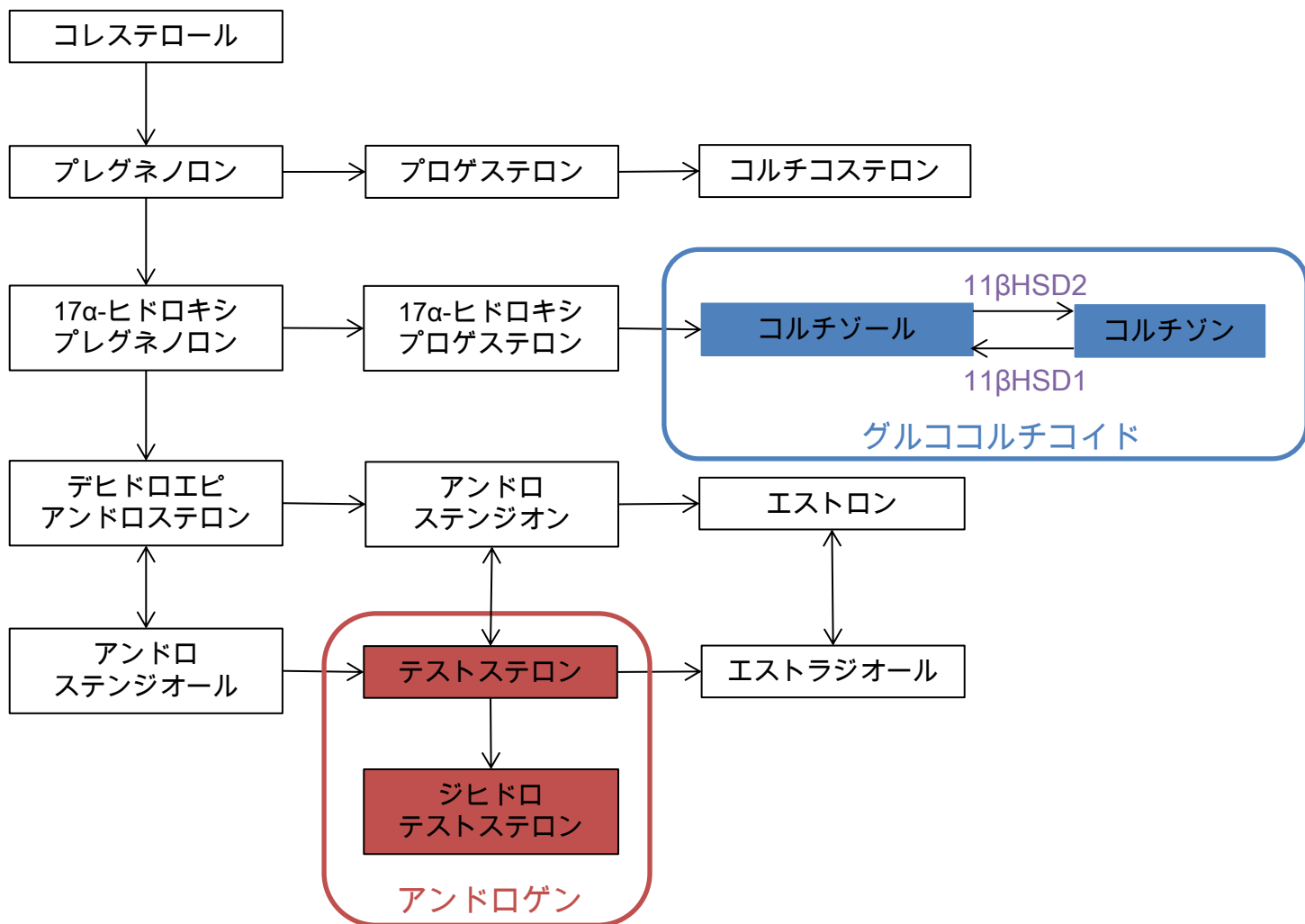
59. Roila F, Molassiotis A, Herrstedt J, et al. 2016 MASCC and ESMO guideline update for the prevention of chemotherapy- and radiotherapy-induced nausea and vomiting and of nausea and vomiting in advanced cancer patients. Ann Oncol. 2016;27:v119-v33.

60. Kerns J, Steinauer J. Management of postabortion hemorrhage: release date November 2012 SFP Guideline #20131. Contraception. 2013;87:331-42.

61. ボナゾール錠 添付文書

## 9. 図

A



B

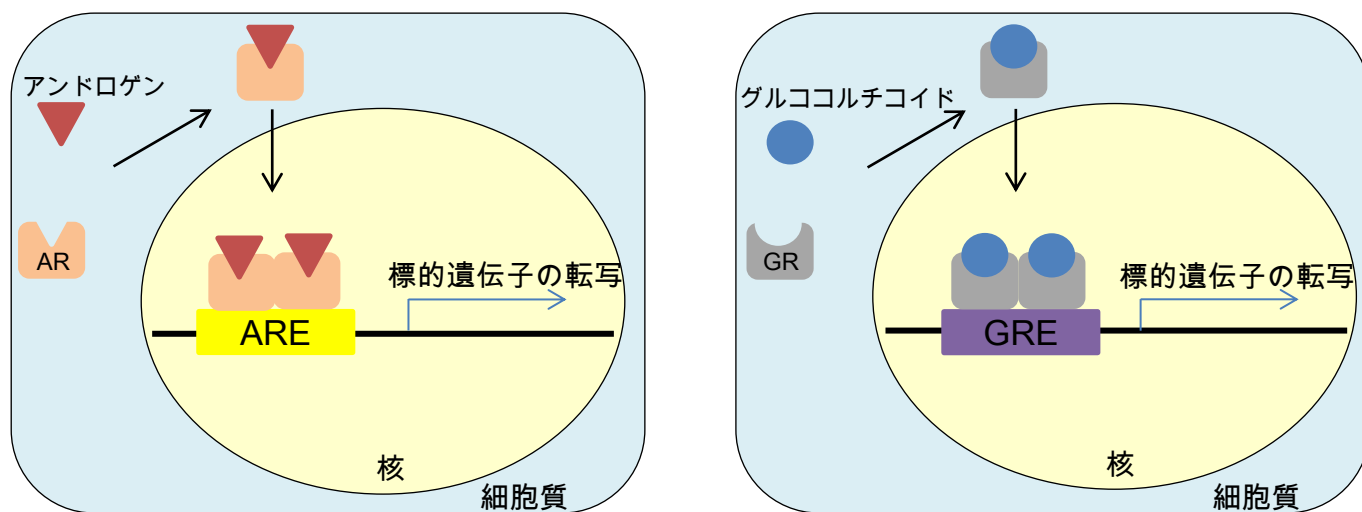
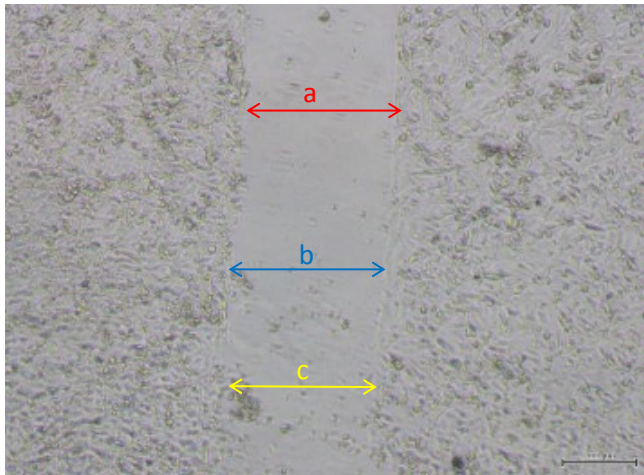
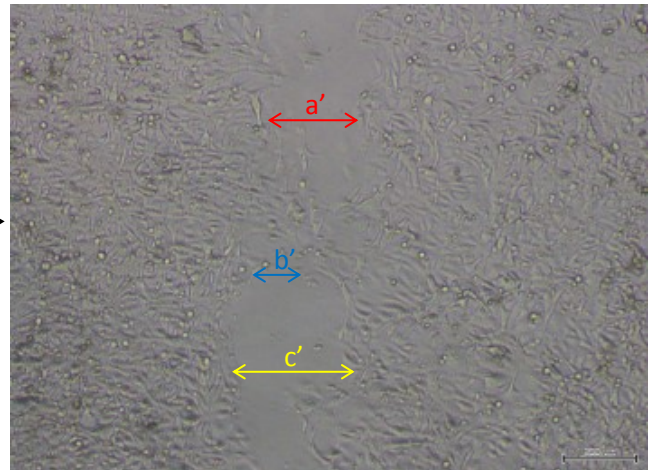


図1. グルココルチコイドの合成及び作用機序の概略図

0時間



20時間



$$\text{間隙 (\%)} = (a'/a, b'/b, c'/c \text{の平均}) \times 100$$

図2. 細胞遊走実験の評価方法

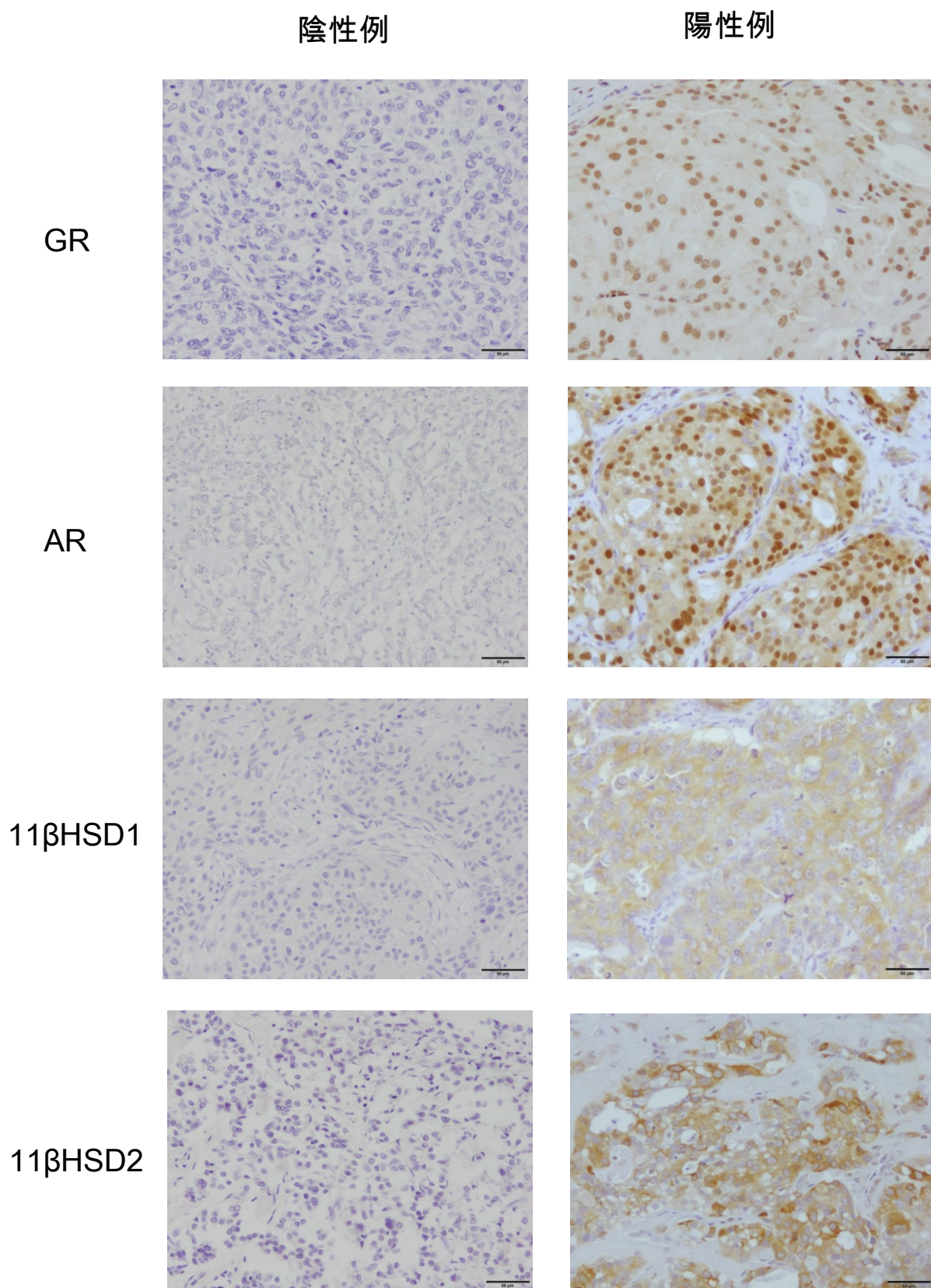


図3. トリプルネガティブ乳癌組織におけるGR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2の免疫組織化学

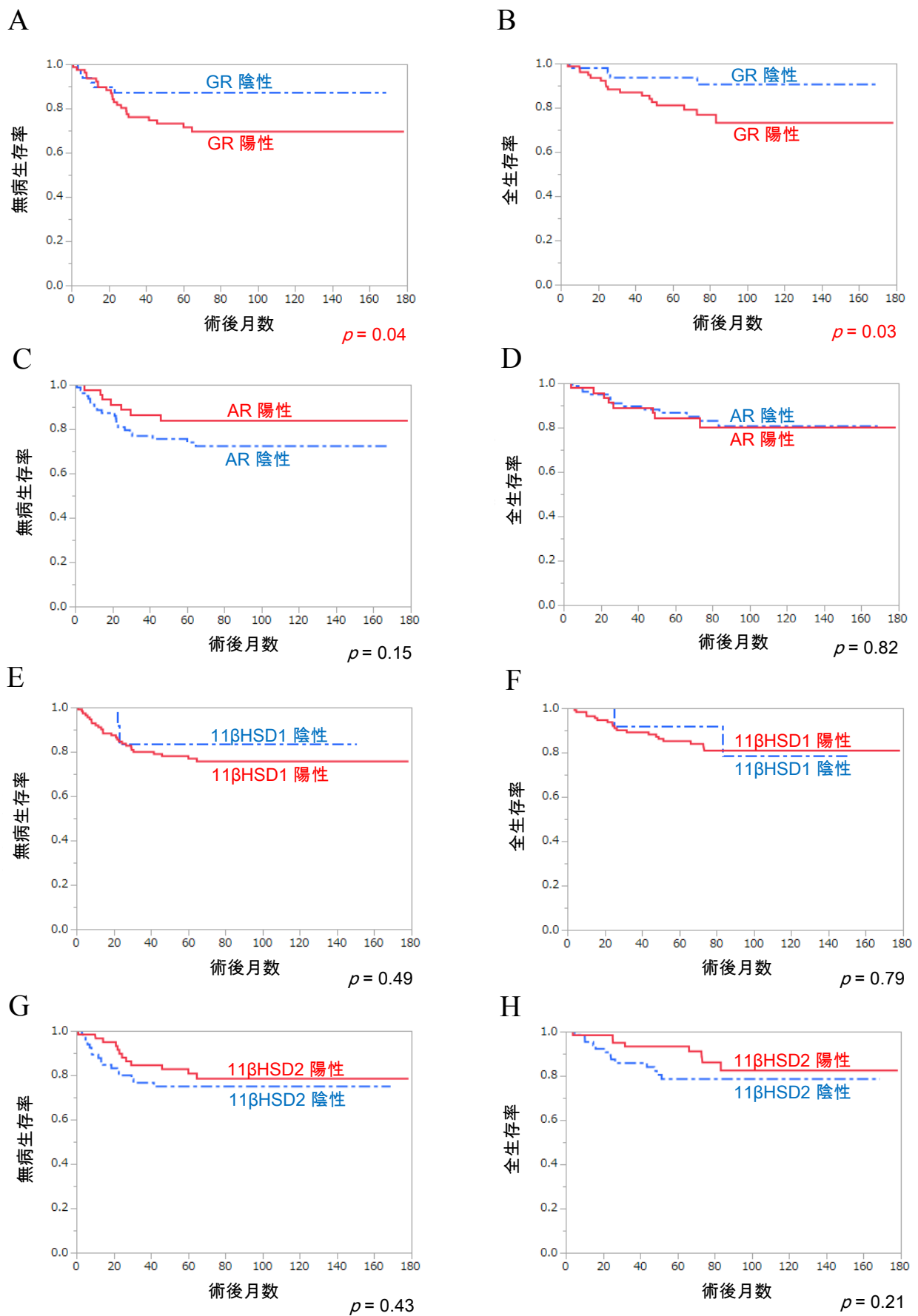
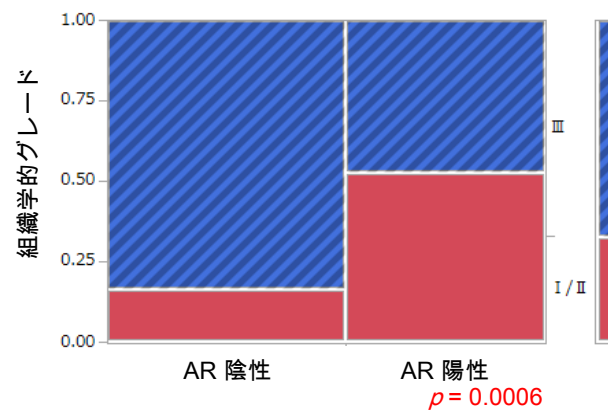
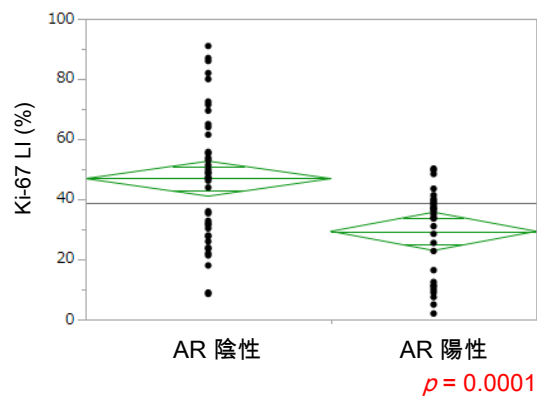


図4. トリプルネガティブ乳癌症例におけるGR, AR, 11βHSD1, 11βHSD2の発現動態と予後との関係

A



B



C

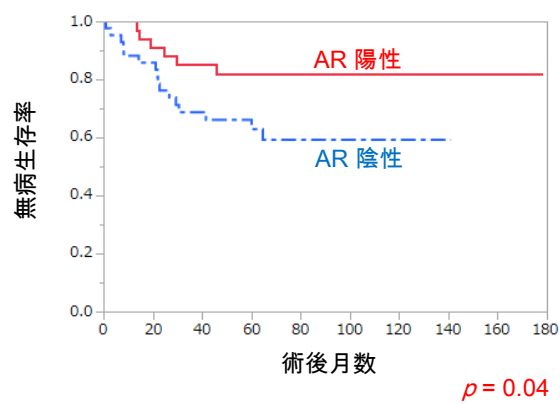
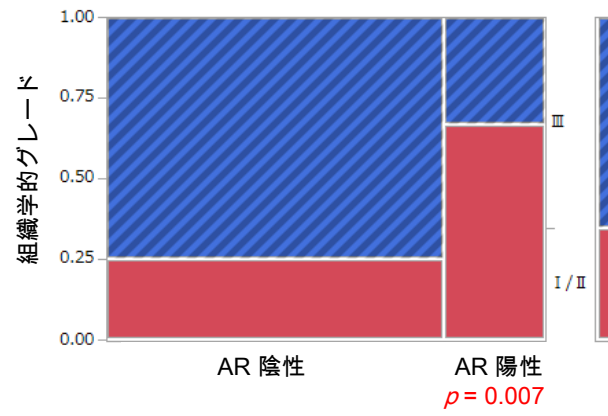


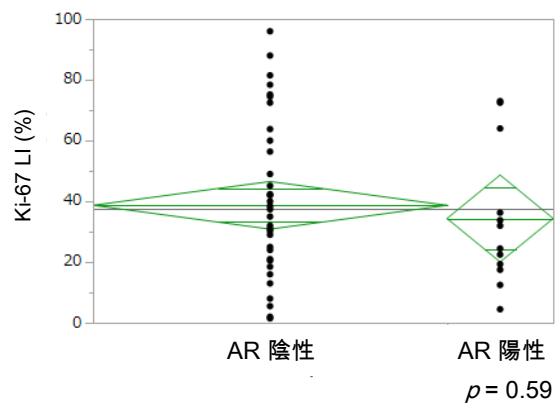
図5. GR陽性トリプルネガティブ乳癌症例におけるARの発現動態と臨床病理学的因子及び予後との関係



A



B



C

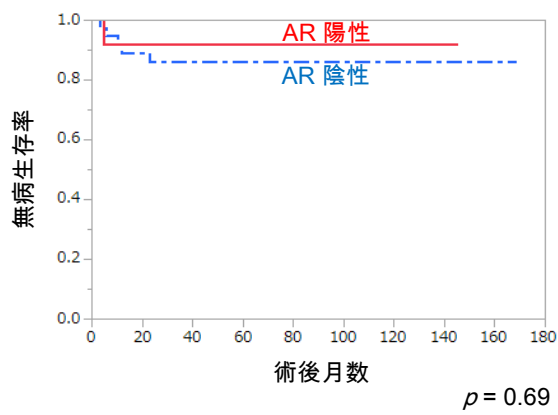
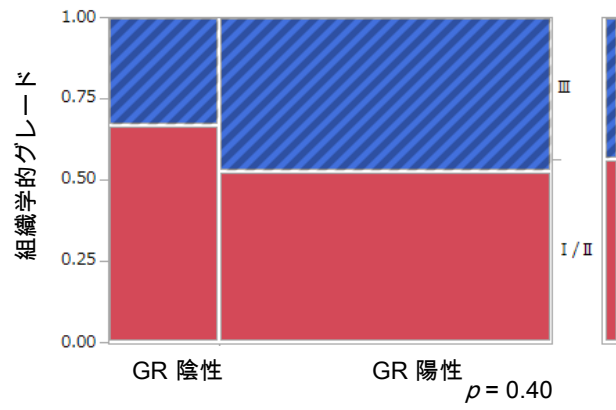
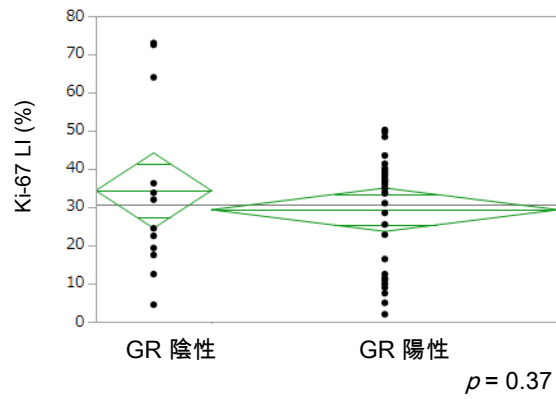


図6. GR陰性トリプルネガティブ乳癌症例におけるARの発現動態と臨床病理学的因子及び予後との関係

A



B



C

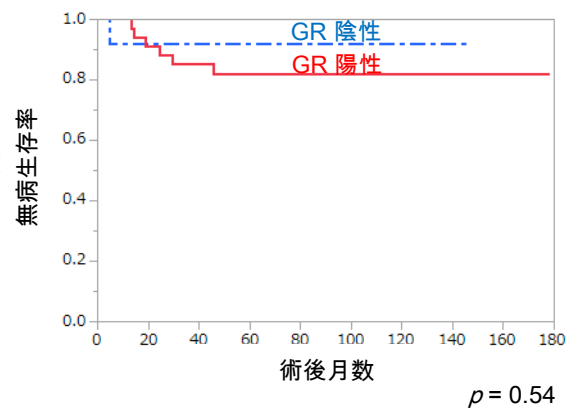
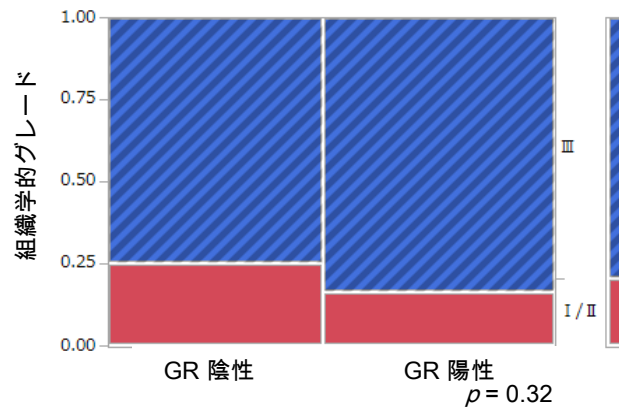
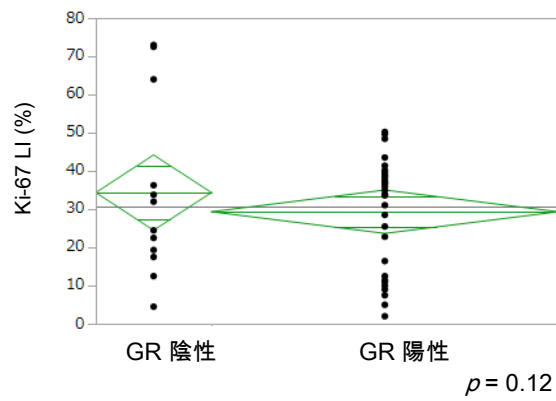


図7. AR陽性トリプルネガティブ乳癌症例におけるGRの発現動態と臨床病理学的因子及び予後との関係

A



B



C

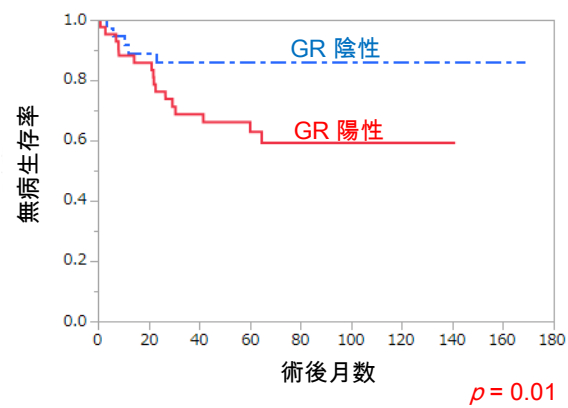
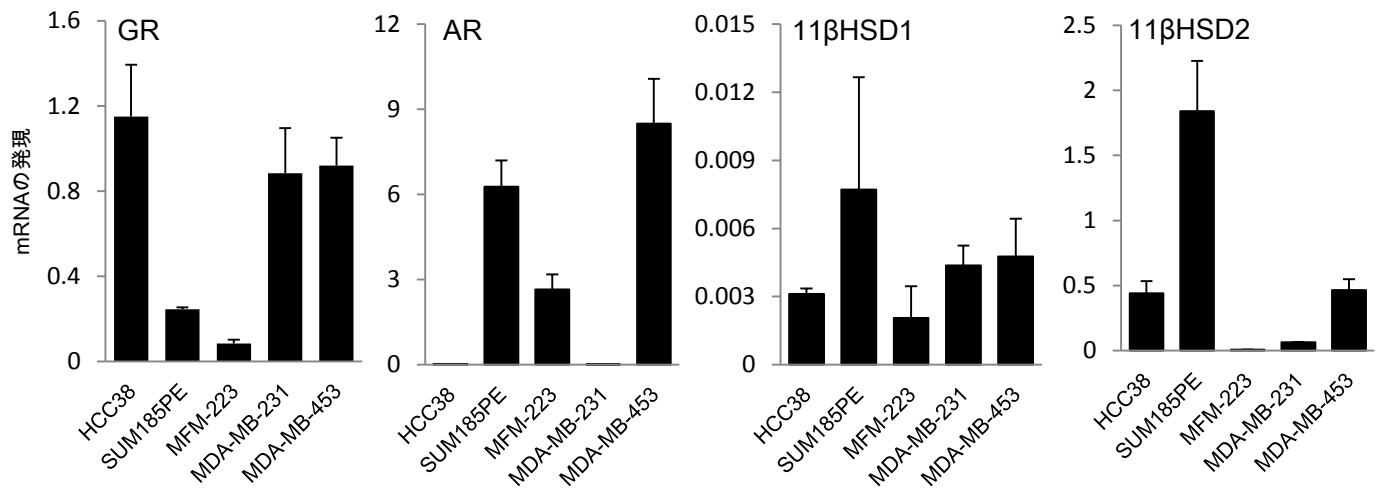
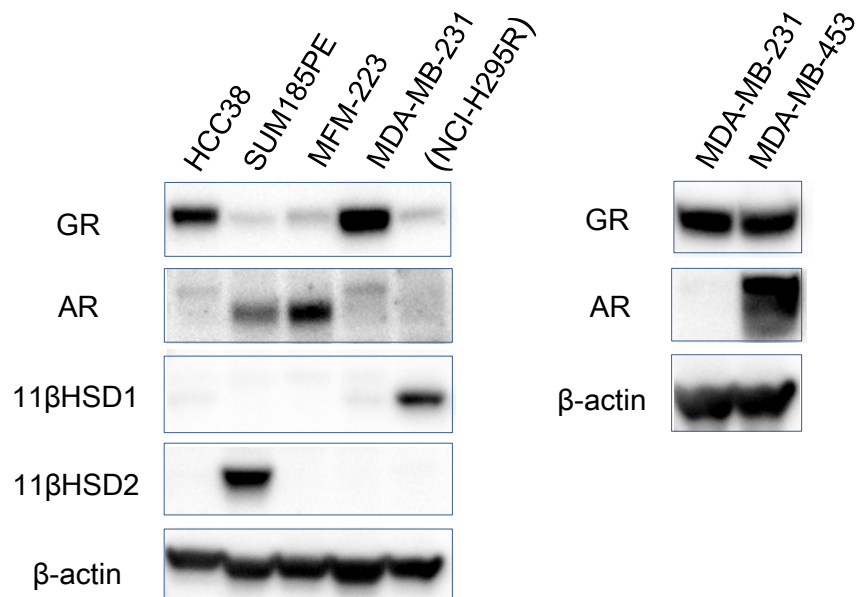


図8. AR陰性トリプルネガティブ乳癌症例におけるGRの発現動態と臨床病理学的因子及び予後との関係

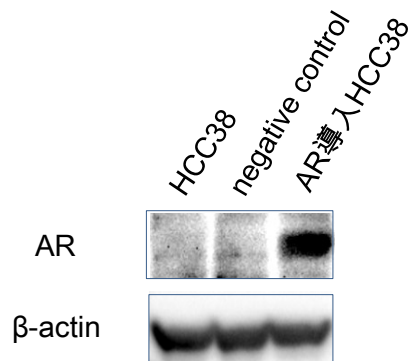
A



B



C



D

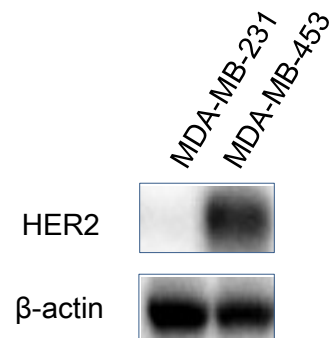


図9. 乳癌細胞株におけるGR, AR, 11βHSD1, 11βHSD2等のmRNA及びタンパクの発現

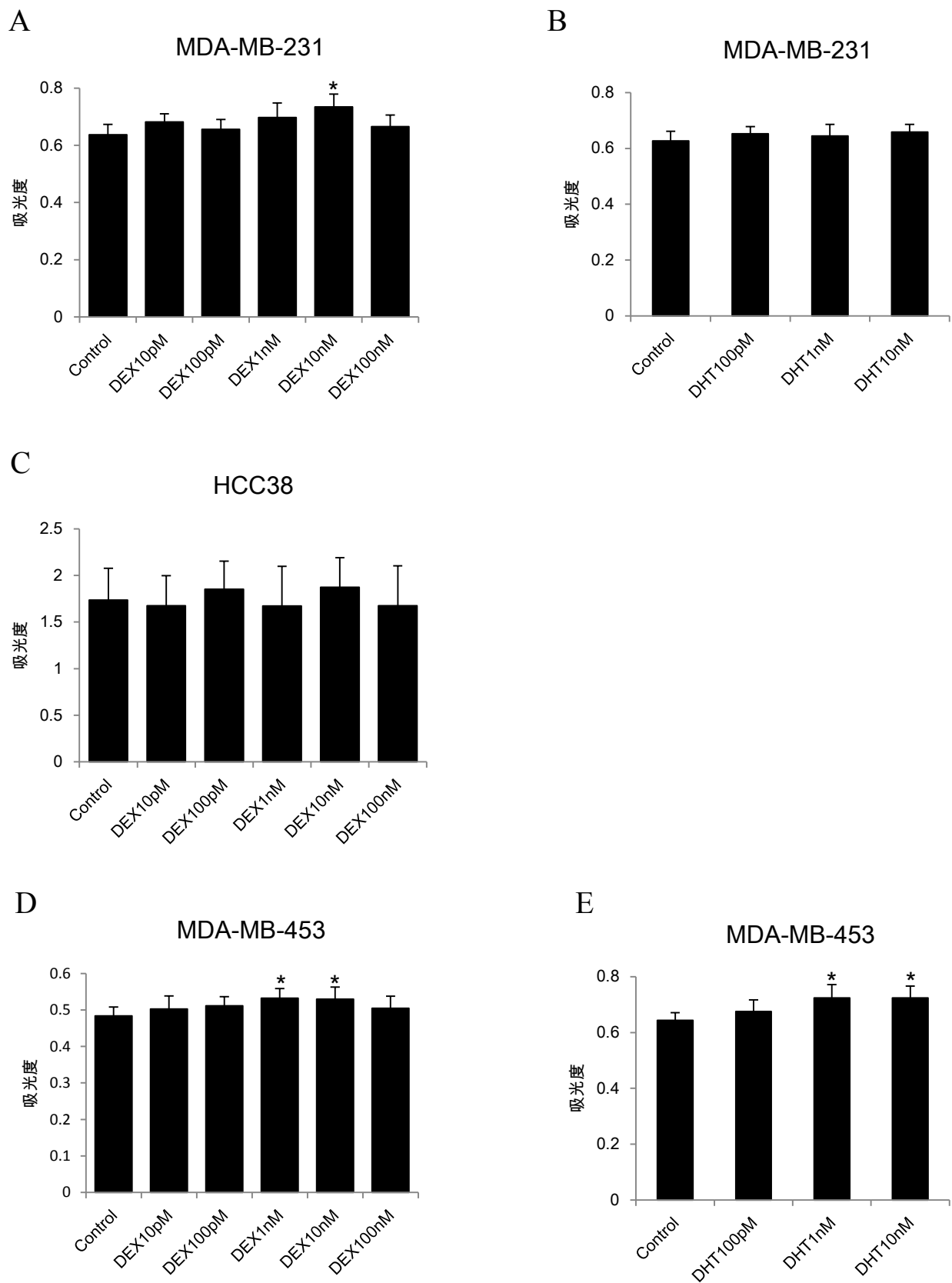
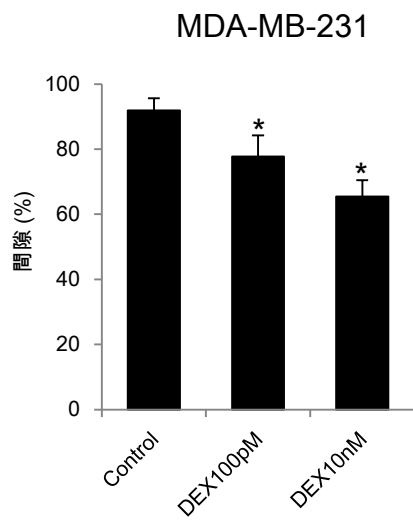
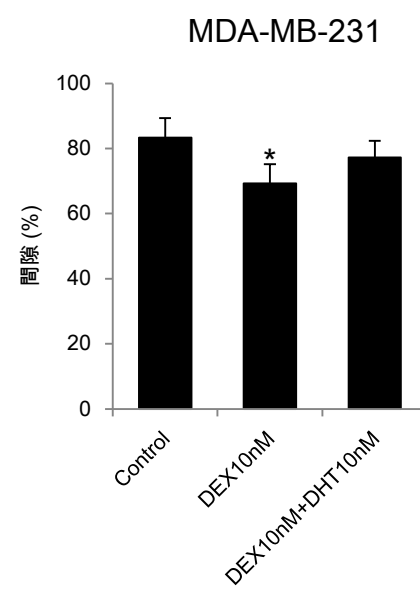


図10. 乳癌細胞株におけるDEX及びDHTが細胞増殖能に及ぼす影響

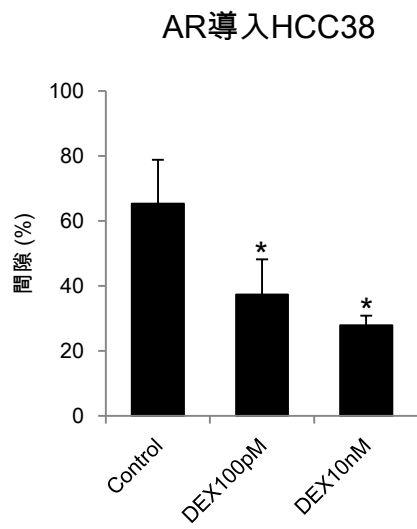
A



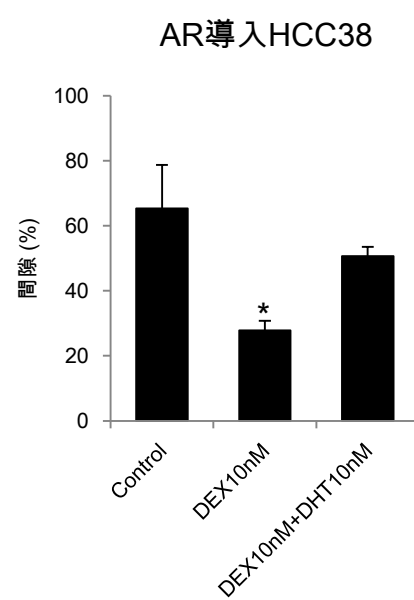
B



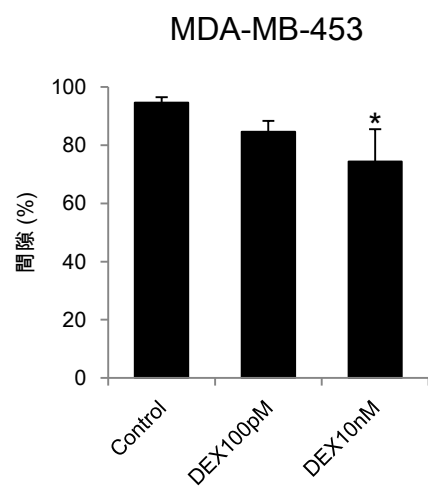
C



D



E



F

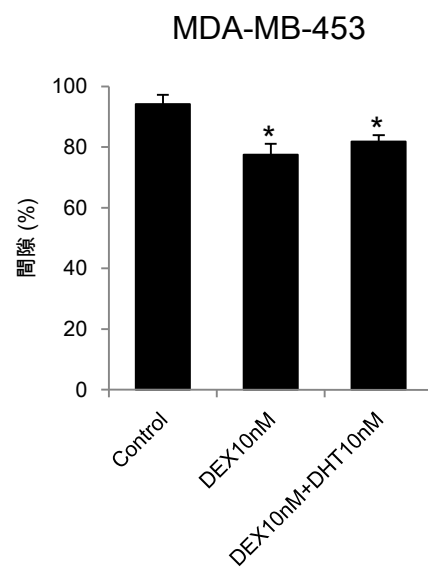
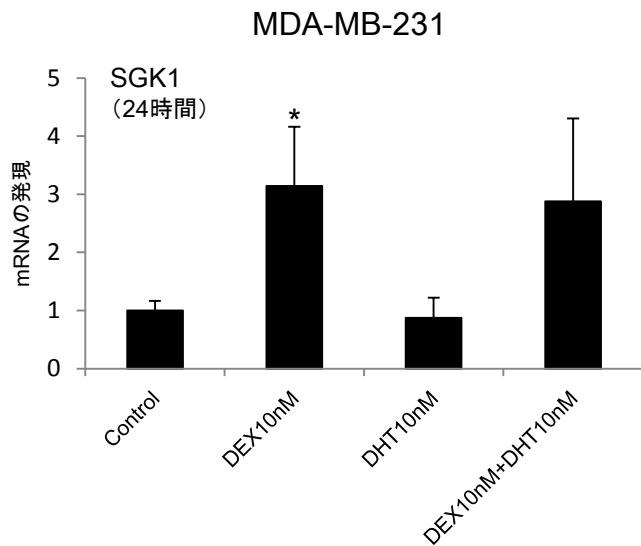
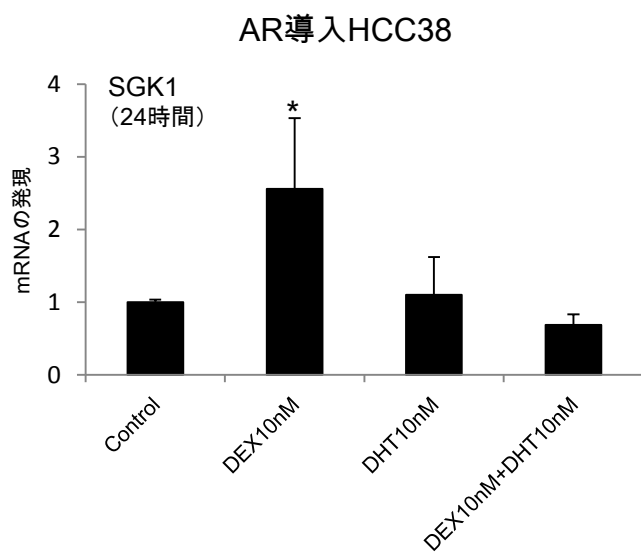


図11. 乳癌細胞株におけるDEX及びDEX/DHTが細胞遊走能に及ぼす影響

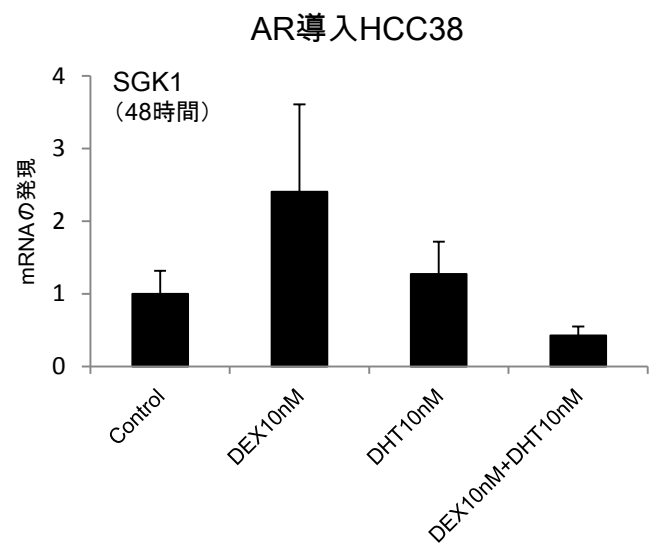
A



B



C



D

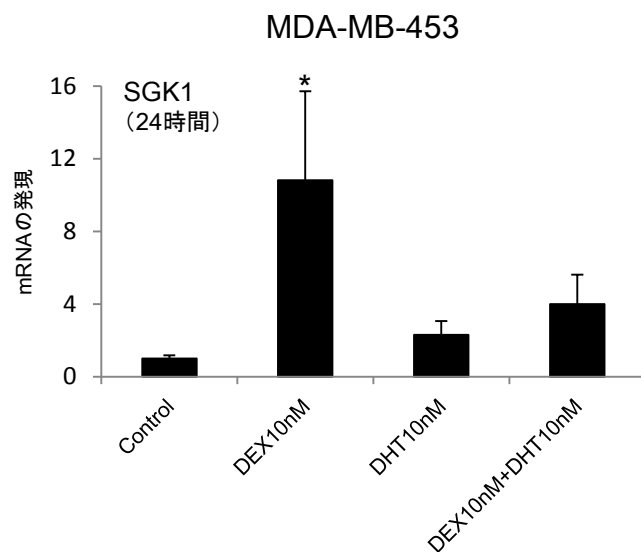
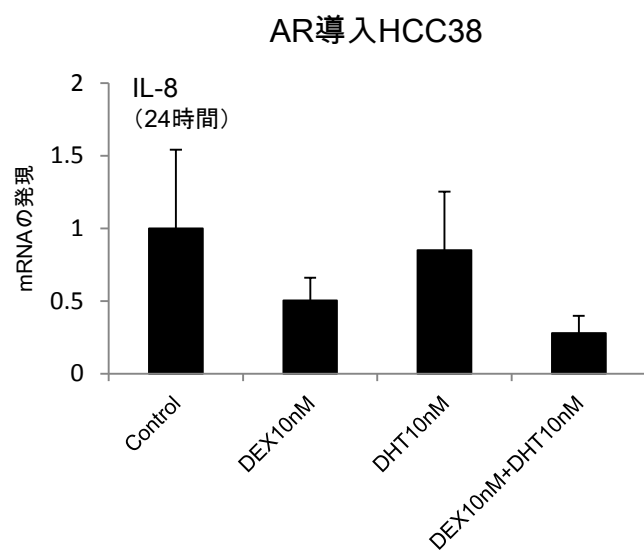


図12. 乳癌細胞株におけるDEX及びDEX/DHTがSGK1のmRNA発現に及ぼす影響

A



B

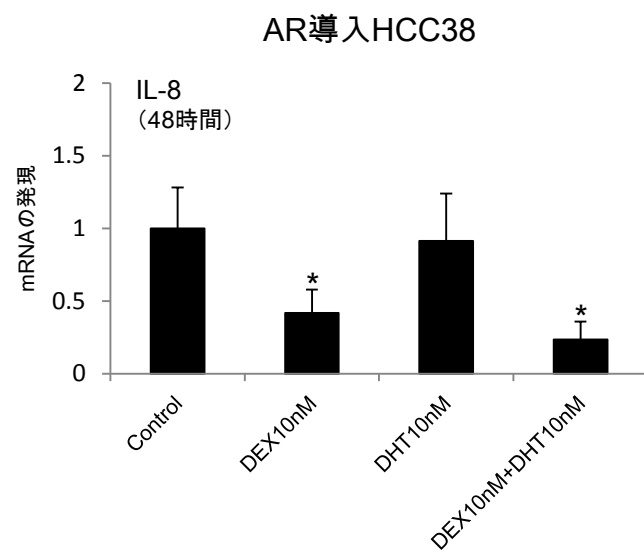


図13. AR導入HCC38におけるDEX及びDEX/DHTがIL-8のmRNA発現に及ぼす影響



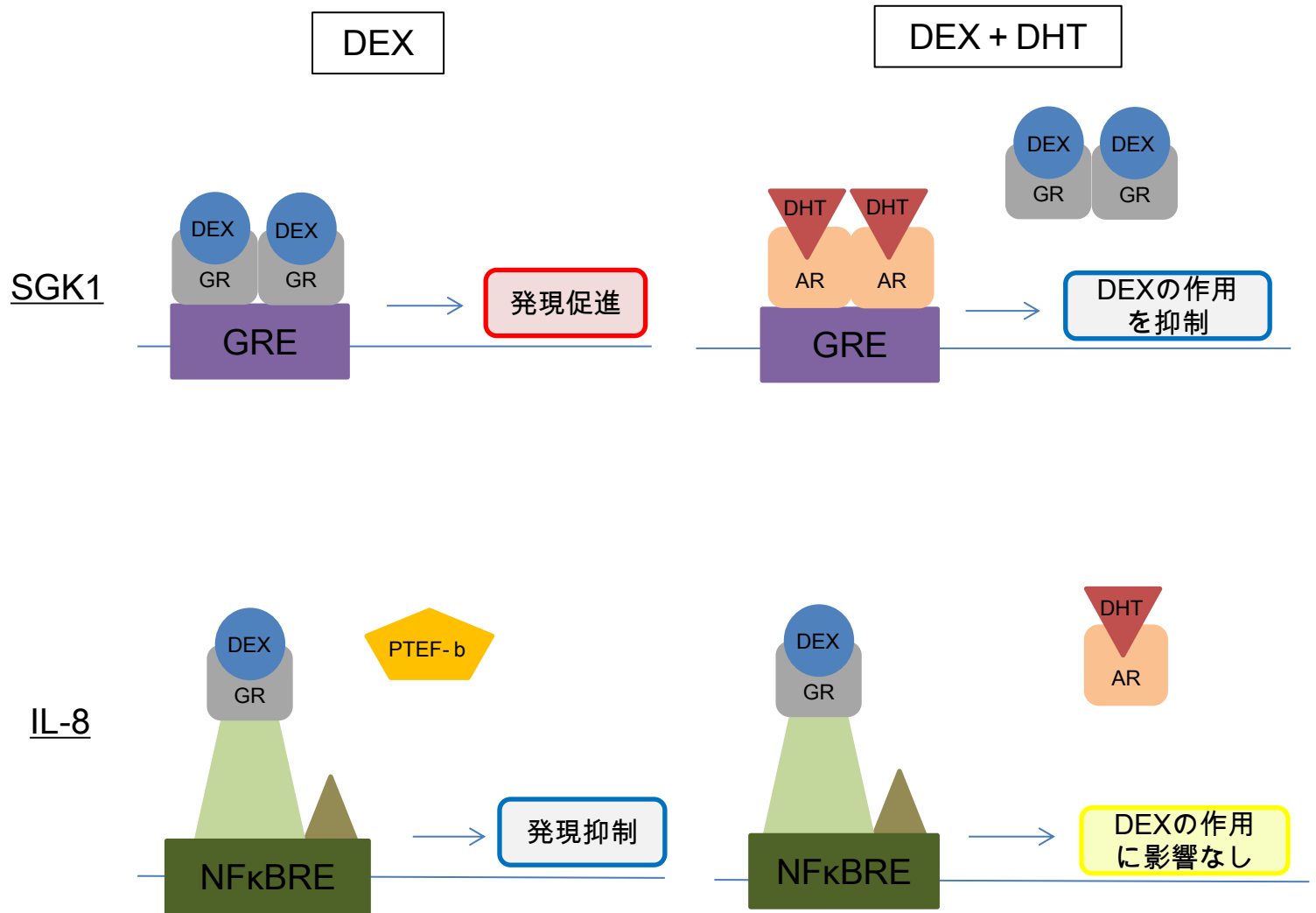
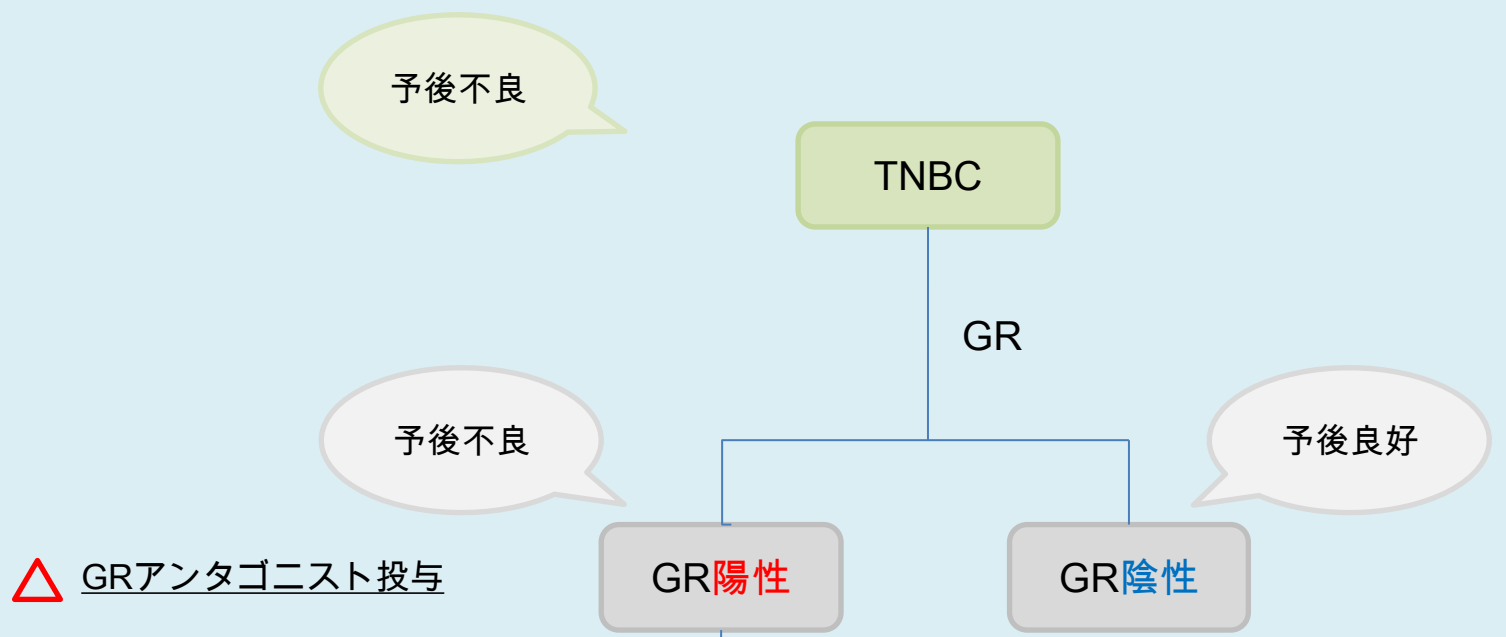


図14. 本研究結果から示唆されるトリプルネガティブ乳癌におけるGRとARの相互作用機序

< 既に報告されている治療戦略 >



< 新たに考えられる治療戦略 >

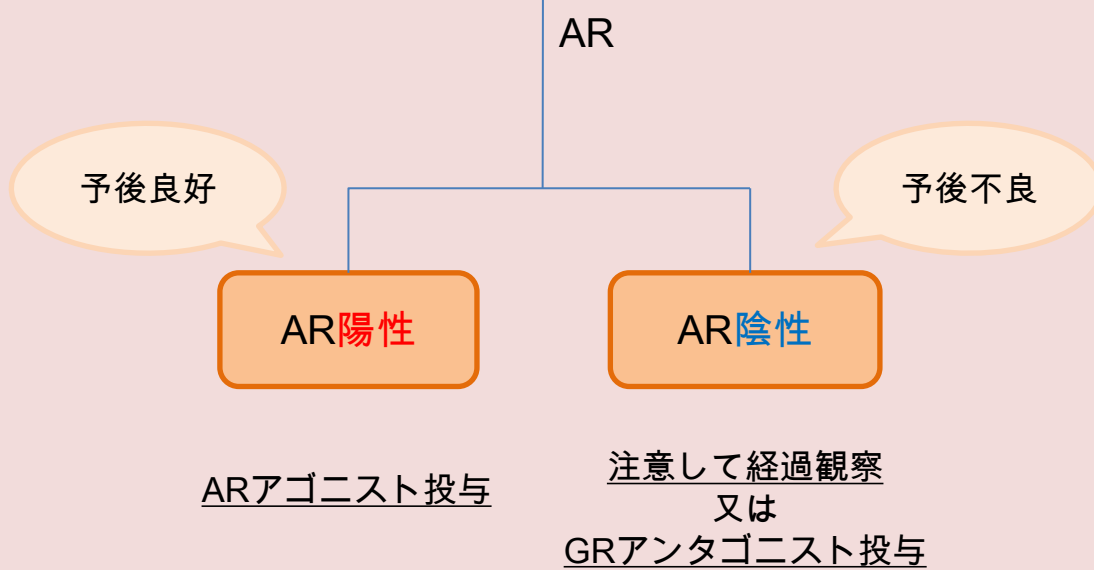


図15. 本研究結果から考えられるトリプルネガティブ乳癌の治療戦略

## 図の説明

### 図 1. グルココルチコイドの合成及び作用機序の概略図

A. グルココルチコイド (GC) の合成の概略図。GC はコレステロールから合成され、 $11\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 1 ( $11\beta$ HSD1) 及び  $11\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 2 ( $11\beta$ HSD2) により活性型 GC (コルチゾール) 及び不活性型 GC (コルチゾン) に変換される。またアンドロゲンもコレステロールから合成される。B. グルココルチコイド (GC) の作用機序の概略図。GC は主に、GC 受容体 (GR) と結合して二量体を形成し、標的遺伝子の GC 応答配列 (GRE) に結合することで転写を促進する。またアンドロゲンも同様に、アンドロゲン—アンドロゲン受容体 (AR) 複合体が二量体を形成してアンドロゲン応答配列 (ARE) に結合することで作用する。

### 図 2. 細胞遊走実験の評価方法

インサート除去後 20 時間時点での間隙の長さの変化率を 9 ヶ所 (全体を 3 視野にわけ、各々 3 ヶ所) で測定して、平均値及び標準偏差を算出した。図は 1 視野あたりの平均値の求め方を示す。

### 図 3. トリプルネガティブ乳癌組織における GR, AR, $11\beta$ HSD1, $11\beta$ HSD2 の免疫組織化学

トリプルネガティブ乳癌組織を用いて GR, AR,  $11\beta$ HSD1,  $11\beta$ HSD2 のタンパク発現を

免疫組織化学にて解析した（倍率: ×200）。スケールバー: 50μm

#### 図 4. トリプルネガティブ乳癌症例における GR, AR, 11βHSD1, 11βHSD2 の発現動態 と予後との関係

GR の発現動態と無病生存率 (A) 及び全生存率 (B) との関係、AR の発現動態と無病生存率(C) 及び全生存率 (D)との関係、11βHSD1 の発現動態と無病生存率 (E) 及び全生存率 (F) との関係、11βHSD2 の発現動態と無病生存率 (G) 及び全生存率 (H) との関係を Kaplan-Meyer 法により解析した。

#### 図 5. GR 陽性トリプルネガティブ乳癌症例における AR の発現動態と臨床病理学的 因子及び予後との関係

GR 陽性トリプルネガティブ乳癌症例における、AR の発現動態と組織学的グレード (A) 及び Ki-67 labeling index (LI) (B), 無病生存率 (C) との関係を検討した。

#### 図 6. GR 陰性トリプルネガティブ乳癌症例における AR の発現動態と臨床病理学的 因子及び予後との関係

GR 陰性トリプルネガティブ乳癌症例における、AR の発現動態と組織学的グレード (A) 及び Ki-67 labeling index (LI) (B), 無病生存率 (C) との関係を検討した。

## 図 7. AR 陽性トリプルネガティブ乳癌症例における GR の発現動態と臨床病理学的

### 因子及び予後との関係

AR 陽性トリプルネガティブ乳癌症例における、GR の発現動態と組織学的グレード (A) 及び Ki-67 labeling index (LI) (B), 無病生存率 (C) との関係を検討した。

## 図 8. AR 陰性トリプルネガティブ乳癌症例における GR の発現動態と臨床病理学的

### 因子及び予後との関係

AR 陰性トリプルネガティブ乳癌症例における、GR の発現動態と組織学的グレード (A) 及び Ki-67 labeling index (LI) (B), 無病生存率 (C) との関係を検討した。

## 図 9. 乳癌細胞株における GR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 等の mRNA 及びタンパクの

### 発現

5 種の乳癌細胞株における GR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 の mRNA 発現 (A) 及びタンパク発現 (B) を各々定量的リアルタイム PCR 及びウェスタンブロッティングにより検討した。NCI-H295R は 11 $\beta$ HSD1 の陽性コントロールとして用いた。また、AR 導入後 24 時間での HCC38 における AR のタンパク発現 (C) 、及び MDA-MB-453 における HER2 のタンパク発現 (D) を確認した。定量的リアルタイム PCR では RPL13A を内因性コントロールとして用い、各々 3 サンプルの定量値の平均値及び標準偏差を算出した。またウェスタンブロッティングにおける内因性コントロールにはいずれも

$\beta$ -actin を用いた。

#### 図 10. 乳癌細胞株における DEX 及び DHT が細胞増殖能に及ぼす影響

MDA-MB-231 におけるデキサメサゾン (DEX) (A) 及びジヒドロテストステロン (DHT) (B) 単独投与時の細胞増殖能の変化、HCC38 における DEX (C) 単独投与時の細胞増殖能の変化、MDA-MB-453 における DEX (D) 及び DHT (E) 単独投与時の細胞増殖能の変化を、WST8 assay を用いて検討した。各々6 サンプルの吸光度の平均値及び標準偏差を算出した。\*  $p < 0.05$

#### 図 11. 乳癌細胞株における DEX 及び DEX/DHT が細胞遊走能に及ぼす影響

MDA-MB-231 におけるデキサメサゾン (DEX) 単独投与 (A) 及び DEX/ジヒドロテストステロン (DHT) 共投与 (B) 時の細胞遊走能の変化、AR 導入 HCC38 における DEX 単独投与 (C) 及び DEX/DHT 共投与 (D) 時の細胞遊走能の変化、MDA-MB-453 における DEX 単独投与 (E) 及び DEX/DHT 共投与 (F) 時の細胞遊走能の変化を、wound healing assay を用いて検討した。3 視野にわけて各々3 ヶ所の細胞間隙の変化率の平均値及び標準偏差を算出した。\*  $p < 0.05$

## 図 12. 乳癌細胞株における DEX 及び DEX/DHT が SGK1 の mRNA 発現に及ぼす

### 影響

MDA-MB-231 におけるデキサメサゾン (DEX) 単独投与及び DEX/ジヒドロテストステロン (DHT) 共投与後 24 時間での SGK1 の mRNA 発現の変化 (A)、AR 導入 HCC38 における DEX 単独投与及び DEX/DHT 共投与後 24 時間 (B) 及び 48 時間 (C) での SGK1 の mRNA 発現の変化、MDA-MB-453 における DEX 単独投与及び DEX/DHT 共投与後 24 時間での SGK1 の mRNA 発現 (D) の変化を検討した。コントロールの mRNA 発現量を 1 とし、それと比較した各々のサンプルの mRNA 量を示す。いずれも 3 サンプルの平均値と標準偏差を算出した。\*  $p < 0.05$

## 図 13. AR 導入 HCC38 における DEX 及び DEX/DHT が IL-8 の mRNA 発現に

### 及ぼす影響

AR 導入 HCC38 におけるデキサメサゾン (DEX) 単独投与及び DEX/ジヒドロテストステロン (DHT) 共投与後 24 時間 (A) 及び 48 時間 (B) での IL-8 の mRNA 発現の変化を検討した。コントロールの mRNA 発現量を 1 とし、それと比較した各々のサンプルの mRNA 量を示す。いずれも 3 サンプルの平均値と標準偏差を算出した。

\*  $p < 0.05$

#### 図 14. 本研究結果から示唆されるトリプルネガティブ乳癌における GR と AR の相互作用機序

SGK1 は GR がグルココルチコイド応答配列 (GRE) に結合することで発現が促進される一方、IL-8 は GR が NFκB 応答配列 (NFκBRE) に結合している positive transcription elongation factor b (P-TEFb) と競合することで発現が抑制される。本研究においてデキサメサゾン (DEX) 及びジヒドロテストステロン (DHT) を共投与した際の SGK1 及び IL-8 の mRNA 発現の変化から、SGK1 では AR が GR と競合して GRE に結合することで DEX の作用が抑制される一方、IL-8 では AR は NFκBRE には結合しないために DEX の作用に影響を及ぼさなかったと考えられる。

#### 図 15. 本研究結果から考えられるトリプルネガティブ乳癌の治療戦略

化学療法抵抗性 GR 陽性トリプルネガティブ乳癌患者における治療戦略として、GR アンタゴニスト投与の有効性が *in vivo* 及び randomized Phase I trial で示されているが、GR アンタゴニスト投与により化学療法時に前投与されるデキサメサゾン (DEX) の効果が打ち消される可能性が危惧される。そこで本研究結果をふまえ、GR 陽性 AR 陽性トリプルネガティブ乳癌患者に対しては AR アゴニストを投与することで、DEX の効果を打ち消すことなく悪性度を低下させ予後の改善につながる可能性が考えられる。



## 10. 表

表 1. 本研究で用いたトリプルネガティブ乳癌症例の臨床病理学的特徴

トリプルネガティブ乳癌組織 (n=131)	
年齢 (歳)	57.4±1.2
腫瘍径 (mm)	
≤ 20	74 (56.9%)
> 20	56 (43.1%)
リンパ節転移	
なし	74 (57.8%)
あり	54 (42.2%)
pStage	
I	50 (39.4%)
II	60 (47.2%)
III	17 (13.4%)
組織学的グレード	
I/II	44 (33.6%)
III	87 (66.4%)
リンパ管侵襲	
なし	75 (57.3%)
あり	56 (42.7%)
Ki-67 LI (%)	38.4±2.0

年齢及び Ki-67 LI は平均±標準誤差として示した。

pStage: Pathological stage (病理病期)

LI: Labeling index

表 2. 本研究で用いた一次抗体

抗原	クローン	抗体の種類	メーカー	手法	希釈倍率
GR	D6H2L	ラビット	Cell Signaling technologies	IHC	1:400
		モノクローナル	(Danvers, MA, USA)	WB	1:1000
AR	AR441	マウス	Dako	IHC	1:50
		モノクローナル	(Carpenteria, CA, USA)	WB	1:250
11 $\beta$ HSD1	EP9406(2)	ラビット	Abcam	IHC	1:200
		モノクローナル	(Cambridge, MA, USA)	WB	1:500
11 $\beta$ HSD2		ラビット	Dr. Z. Krozowski より 寄贈	IHC	1:150
		ポリクローナル			
11 $\beta$ HSD2	C-9	マウス	Santa Cruz Biotechnology	WB	1:500
		モノクローナル	(Dallas, TX, USA)		
Ki-67	MIB1	マウス	Dako	IHC	1:100
		モノクローナル			
$\beta$ -actin	2D4H5	マウス	Proteintech	WB	1:5000
		モノクローナル	(Rosemont, IL, USA)		

GR: Glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体)

AR: Androgen receptor (アンドロゲン受容体)

11 $\beta$ HSD1: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 1)

11 $\beta$ HSD2: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 2)

IHC: Immunohistochemistry (免疫組織化学)

WB: Western blotting (ウェスタンブロッティング)

表 3. 本研究で用いた乳癌細胞株

細胞名	サブタイプ	メーカー
MDA-MB-231	トリプルネガティブ	ATCC (Manassas, VA, USA)
HCC38	トリプルネガティブ	ATCC
MFM-223	トリプルネガティブ	Cell Bank Australia (Westmead, NSW, Australia)
SUM185PE	トリプルネガティブ	Asterand (Detroit, MI, USA)
MDA-MB-453	HER2 陽性 ER 陰性	ATCC

ATCC: American Type Culture Collection

表 4. 本研究で用いたプライマー

プライマー名	配列 (5'→3')
GR	Forward AGT GGT TAA AAT CTC CTT AAC TAT TGC T
	Reverse GGT ATC TGA TTG GTG ATG ATT TCA GCT A
AR	Forward GTC AAA AGC GAA ATG GGC CCC
	Reverse CTT CTG GGT TGT CTC CTC AGT
11 $\beta$ HSD1	Forward TGT TCG AAA TCT TGA GGT TCT CTC T
	Reverse GTA GTA GGC CAT GAA GAG CCC
11 $\beta$ HSD2	Forward TGC TTC AAG ACA GAG TCA GTG
	Reverse GGC ATC TAC AAC TGG GGT GA
SGK1	Forward AGG GCA GTT TTG GAA AGG TT
	Reverse CTG TAA AAC TTT GAC TGC ATA GAA CA
IL-8	Forward AGG AGT GCT AAA GAA CTT AGA TGT CAG TGC
	Reverse GTG GTC CAC TCT CAA TCA CTC TCA GTT C
RPL13A	Forward CCT GGA GGA GAA GAG GAA AG
	Reverse TTG AGG ACC TCT GTG TAT TT

GR: Glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体)

AR: Androgen receptor (アンドロゲン受容体)

11 $\beta$ HSD1: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 1)

11 $\beta$ HSD2: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 2)

SGK1: Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1

RPL13A: Ribosomal protein L 13a

表 5. トリプルネガティブ乳癌組織における GR, AR, 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 の H-score/modified H-score

	GR	AR	11 $\beta$ HSD1	11 $\beta$ HSD2
中央値	20	2	101.5	9.25
最小値-最大値	0-220	0-270	3-256.25	3-256.25
陽性症例数 (%)	79 (60.3%)	48 (36.6%)	117 (89.3%)	62 (47.3%)

GR: Glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体)

AR: Androgen receptor (アンドロゲン受容体)

11 $\beta$ HSD1: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 1)

11 $\beta$ HSD2: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 2)

表 6. トリプルネガティブ乳癌症例における GR, AR の発現と臨床病理学的因子との関係

	GR			AR		
	陰性	陽性	p 値	陰性	陽性	p 値
年齢 (歳)	57.0±2.0	57.6±1.6	0.80	54.7±1.5	62.0±2.0	0.003
腫瘍径 (mm)						
≤ 20	27 (20.8%)	47 (36.2%)	0.34	47 (36.2%)	27 (20.8%)	0.92
> 20	25 (19.2%)	31 (23.9%)		36 (27.7%)	20 (15.4%)	
リンパ節転移						
なし	31 (24.2%)	43 (33.6%)	0.44	49 (38.3%)	25 (19.5%)	0.42
あり	19 (14.8%)	35 (27.3%)		32 (25.0%)	22 (17.2%)	
pStage						
I	21 (16.5%)	29 (22.8%)	0.59	34 (26.8%)	16 (12.6%)	0.23
II	21 (16.5%)	39 (30.7%)		34 (26.8%)	26 (20.5%)	
III	8 (6.3%)	9 (7.1%)		13 (10.2%)	4 (3.2%)	
組織学的グレード						
I/ II	18 (13.7%)	26 (19.9%)	0.83	17 (13.0%)	27 (20.6%)	<0.0001
III	34 (26.0%)	53 (40.5%)		66 (50.4%)	21 (16.0%)	
リンパ管侵襲						
なし	26 (19.9%)	49 (37.4%)	0.17	45 (34.4%)	30 (22.9%)	0.35
あり	26 (19.9%)	30 (22.9%)		38 (29.0%)	18 (13.7%)	
Ki-67 LI (%)	37.7±3.1	38.9±2.5	0.76	42.9±2.4	30.6±3.1	0.002
GR						
陰性				40 (30.5%)	12 (9.2%)	0.008
陽性				43 (32.8%)	36 (27.5%)	

年齢及び Ki-67 LI は平均±標準誤差として示した。

GR: Glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体)

AR: Androgen receptor (アンドロゲン受容体)

pStage: Pathological stage (病理病期)

LI: Labeling index

表 7. トリプルネガティブ乳癌症例における 11 $\beta$ HSD1, 11 $\beta$ HSD2 の発現と臨床病理学的因子との関係

	11 $\beta$ HSD1			11 $\beta$ HSD2		
	陰性	陽性	p 値	陰性	陽性	p 値
年齢 (歳)	56.6 $\pm$ 3.7	57.5 $\pm$ 1.3	0.81	55.8 $\pm$ 1.7	59.1 $\pm$ 1.8	0.18
腫瘍径 (mm)						
$\leq 20$	8 (6.2%)	66 (50.8%)	0.98	39 (30.0%)	35 (26.9%)	0.91
$> 20$	6 (4.6%)	50 (38.5%)		29 (22.3%)	27 (20.8%)	
リンパ節転移						
なし	6 (4.7%)	68 (53.1%)	0.22	42 (32.8%)	32 (25.0%)	0.16
あり	8 (6.3%)	46 (35.9%)		24 (18.8%)	30 (23.4%)	
pStage						
I	4 (3.2%)	46 (36.2%)	0.66	27 (21.3%)	23 (18.1%)	0.82
II	8 (6.3%)	52 (40.9%)		29 (22.8%)	31 (24.4%)	
III	2 (1.6%)	15 (11.8%)		9 (7.1%)	8 (6.3%)	
組織学的グレード						
I/ II	7 (5.3%)	37 (28.2%)	0.16	17 (13.0%)	27 (20.6%)	0.02
III	7 (5.3%)	80 (61.1%)		52 (39.7%)	35 (26.7%)	
リンパ管侵襲						
なし	8 (6.1%)	67 (51.2%)	0.99	44 (33.6%)	31 (23.7%)	0.11
あり	6 (4.6%)	50 (38.2%)		25 (19.1%)	31 (23.7%)	
Ki-67 LI (%)	36.4 $\pm$ 6.0	38.7 $\pm$ 2.1	0.72	42.6 $\pm$ 2.6	33.7 $\pm$ 2.8	0.02
GR						
陰性	6 (4.6%)	46 (35.1%)	0.79	29 (22.1%)	23 (17.6%)	0.56
陽性	8 (6.1%)	71 (54.2%)		40 (30.5%)	39 (29.8%)	
AR						
陰性	9 (6.9%)	74 (56.5%)	0.93	50 (38.2%)	33 (25.2%)	0.02
陽性	5 (3.8%)	43 (32.8%)		19 (14.5%)	29 (22.1%)	
11 $\beta$ HSD1						
陰性				9 (6.9%)	5 (3.8%)	0.35
陽性				60 (45.8%)	57 (43.5%)	

年齢及び Ki-67 LI は平均 $\pm$ 標準誤差として示した。

GR: Glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体)

AR: Androgen receptor (アンドロゲン受容体)

11 $\beta$ HSD1: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 1)

11 $\beta$ HSD2: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 2)

pStage: Pathological stage (病理病期) LI: Labeling index

表 8. ヒト乳癌組織を用いた実験結果の概要

	GR	AR	11 $\beta$ HSD1	11 $\beta$ HSD2	GR/AR
組織学的 グレード	有意な関係 なし	AR 陽性は AR 陰性に比べ 低い	有意な関係 なし	11 $\beta$ HSD2 陽性は 11 $\beta$ HSD2 陰性に比べ 低い	GR 陽性/AR 陽性は GR 陽性/AR 陰性に比べ 低い
Ki-67 LI	有意な関係 なし	AR 陽性は AR 陰性に比べ 低い	有意な関係 なし	11 $\beta$ HSD2 陽性は 11 $\beta$ HSD2 陰性に比べ 低い	GR 陽性/AR 陽性は GR 陽性/AR 陰性に比べ 低い
無病生存率	GR 陽性は GR 陰性に比べ 予後不良	有意な関係 なし	有意な関係 なし	有意な関係 なし	GR 陽性/AR 陽性は GR 陽性/AR 陰性に比べ 予後良好

GR: Glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体)

AR: Androgen receptor (アンドロゲン受容体)

11 $\beta$ HSD1: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 1)

11 $\beta$ HSD2: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$  ヒドロキシ脱水素酵素タイプ 2)

LI: Labeling index



表 9. ヒト乳癌細胞株を用いた実験結果の概要

細胞株	性質	増殖能	遊走能		GC 応答遺伝子			
					SGK1		IL-8	
					DEX に よる影響	DEX による変化 に対し DHT が 与える影響	DEX に よる影響	DEX による変化 に対し DHT が 与える影響
MDA-MB-231	GR+AR± TNBC	↑	↑	↔	↑	↔	—	—
HCC38	GR+AR± TNBC	↔	—	—	—	—	—	—
AR 導入 HCC38	GR+AR+ TNBC	—	↑	↓	↑	↓	↓	↔
MDA-MB-453	GR+AR+ HER2+	↑	↑	↔	↑	↓	—	—

GC: Glucocorticoid (グルココルチコイド)

SGK1: Serum and glucocorticoid-regulated kinase-1

IL-8: Interleukin-8

DEX: Dexamethasone (デキサメサゾン)

DHT: Dihydrotestosterone (ジヒドロテストステロン)

GR: Glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体)

AR: Androgen receptor (アンドロゲン受容体)

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2 (ヒト上皮増殖因子受容体 2 型)

TNBC: Triple-negative breast cancer (トリプルネガティブ乳癌)

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました、東北大学大学院医学系研究科乳腺・内分泌外科 石田 孝宣 教授、病理診断学分野 笹野 公伸 教授に謹んで感謝の意を表します。また、日々多くの御指導、御助言をいただき適切な方向へ導いて下さりました、病理診断学分野 マクナマラ キーリー 助教、災害科学国際研究所災害医科学研究部門災害産婦人科学分野 三木 康宏 講師、病理診断学分野 岩渕 英里奈 先生に厚く御礼申し上げます。日頃から乳癌に関する知識をご教授いただくとともに、研究に関しても多くの御助言をいただきました、乳腺・内分泌外科学分野 多田 寛 准教授、宮下 穰 講師、原田 成美 助教に心より感謝申し上げます。貴重な症例をご提供いただきました、相良病院 相良 安昭 先生、大井 恭代 先生、雷 哲明 先生、久留米大学医療センター病理診断科 山口 倫 先生、JCHO 久留米総合病院 田中 真紀 先生に感謝致します。また本論文作成に関しまして、審査員として多くの御助言をいただきました、内分泌応用医科学分野 高橋 和広 教授、分子内分泌学分野 菅原 明 教授、病理部 渡辺 みか 准教授、病理検査学分野 高木 清司 講師に感謝いたします。最後に、実験手技に関して丁寧なご指導をいただきました、病理診断学分野 小野寺 好明 先生、小野 克彦 氏、諸橋 明子 氏、東北医科薬科大学 端 秀子 助教、伊勢 和恵 氏に感謝致します。最後に、研究生生活を送るにあたり多大なるお力添えをいただきました、病理診断学分野 齊藤 涼子 講師、加藤 みづき 氏をはじめ、病理診断学分野及び乳腺・内分泌外科学分野の皆様感謝致します。